

# Containment szabályozás

## Biológiai elszigetelés

A biológiai elszigetelés alkalmazása a biotechnológiai iparban

2016.04.05.  
Csernyánszky Vera  
Várnai Krisztina



# Tartalom

- A biobiztonság és a biológiai elszigetelés kezdetei
- USA irányelvek és szervezetek
  - Elszigeteltségre használt gátak (NIH 1976) az r-DNS technológiában
    - Fizikai
    - Biológiai
    - Üzemeltetési
  - FDA, EPA, USDA, OSHA
- Nemzetközi biotechnológiai szabályozás áttekintése
- OECD, Európai irányelvek

# A biobiztonság és a biológiai elszigetelés kezdetei

- Természetből izolált mikroorganizmusok → fő cél: a folyamat és a termék védelme
- 1969: osztályozási referencia a fertőző ágensekkel dolgozó személyek és laborok részére
  - ❖ Az első biobiztonági előírás – vakcinagyártás

- r-DNS technológia, génszabási technikák → genetikailag módosított, transzgénikus organizmusok (TGO)
- r-DNS technológia:
  - ❖ idegen gén bejuttatása → rekombinálódik → kifejeződik és öröklődik
  - ❖ A mikroba ennek segítségével számára idegen fehérjét tud termelni
  - ❖ Gyógyszeripar, környezetvédelem
- Elkülönült, és egyre sürgetőbbé vált az r-DNS technológia biológiai elszigetelésének kérdésköre
- Cél: a transzgénikus organizmusokat még a folyamaton belül el tudják határolni → ne juthasson ki

# NIH szabályozások az üzemi gyakorlatban

- NIH: National Institutes of Health
- 1976: NIH: Irányelvek a rekombináns DNS kutatásokra
  - ❖ biológiai gát: transzgénikus organizmusok ne tudjanak túlélni ha kijutnak (biológiai elszigetelés)
    - baktériumokat: legyengítik, mutánsok használata
    - növényi, állati sejtek: nem képesek életben maradni
  - ❖ üzemeltetési eljárás és gyakorlat:
    - A helyes mikrobiológiai gyakorlat alapelveit követve → biológiai biztonsághoz hozzájárulunk
    - minden dolgozó naprakész legyen (szabályzat, kockázat)

## ❖ fizikai gát:

- elsődleges fizikai gát: minden olyan fizikai eszköz, mely megakadályozza a mikroba kijutását
  - biológiai biztonsági fülkék
  - személyvédelmi eszközök: ruházat, arcvédő, légzőkészülék...
  - zárt rendszerek, folyamatok
- másodlagos védelem: a létesítmény tervezése
  - levegőztető rendszer
  - elhatárolt munkaterületek
  - autoklávok

# USA irányelvek és szabályozások

- Általános szabályozás:
  - 5 szövetségi szervezet működik, melyek a biotechnológiai ipar részére a biobiztonság és a biológiai elszigetelés irányelveket kidolgozzák:
    - Food and Drug Administration (FDA)
    - Environmental Protection Agency (EPA)
    - United States Development of Agriculture (USDA)
    - National Institutes of Health (NIH)
    - Occupational Safety and Health Administration (OSHA)

# NIH irányelvek

- Az amerikai és nemzetközi biobiztonság és biológiai elszigetelés alapelvei
  - „NIH guidelines for recombinant DNA research”  
1976
- Alapja: patogén mikroorganizmusokkal végzett orvosi vizsgálatok
- Enyhítés (ahogy egyre több ismerettel rendelkeztek)
- A kockázat mértéke → biobiztonsági szintek (BL-1,2,3), GLSP



# Üzemszintű biológiai elszigetelés (10 liter felett)

- GLSP (Good Large Scale Production) : 3 kritérium
  1. gazda szervezet:
    - a gazda organizmus nem lehet patogén
    - dokumentáció
    - optimum a megfelelő működés és a legyengítés között
  2. a transzgénikus organizmus is feleljen meg eme kritériumnak
  3. a vektor/inzert:
    - ❖ legyen jól karakterizált, ismert felépítésű
    - ❖ ne tartalmazzon nem ismert, esetleg ártalmas szekvenciát
    - ❖ ne legyen nagy, de a funkcióját még ellássa
    - ❖ ne javítsa a túlélés lehetőségét
    - ❖ lehetőleg legyen stabil
    - ❖ ne legyen benne olyan szelekciós marker, melyet örökítve → gyógyszer rezisztencia, növénybetegség

# NIH követelmények rekombináns technológia üzemi használatára (GLSP elvek alapján)

Elszigetelési gyakorlat	GLSP	BL <sub>1</sub> -LS	BL <sub>2</sub> -LS	BL <sub>3</sub> -LS
Intézményi kód (személyi biztonság)	+	+	+	+
Oktatás a takarítóknak és az alkalmazottaknak	+	+	+	+
Munkaruházat, ruhacsere, kézmosási lehetőségek biztosítása	+	+	+	+
Evés, ivás, dohányzás, szájjal pipettázás, kozmetikumok használata tilos	+	+	+	+
Baleset esetére cselekvési terv	+	+	+	+
Aeroszol képződés	Cs	Cs	M	M
Zárt tartályok, elsődleges elszigetelési eszközök	o	+	+	+

---

Cs: csökkentés

M: megelőzés

BL-LS: Biosafety level - large scale

elszigetelési gyakorlat	GLSP	BL1-LS	BL2-LS	BL3-LS
Mikrobák inaktiválása a learatás előtt	0	+	+	+
A gyártási folyamat hulladékainak inaktiválása	0	+	+	+
Kiömlés esetén cselekvési terv	0	+	+	+
Habzástgátlás (aeroszol képzőség ellen)	0	M	Cs	Cs
Véggáz tisztítás a kiengedés előtt (mielőtt kilép a zárt rendszerből)	0	M	Cs	Cs
Orvosi felügyelet	0	0	+	+
Biológiai veszélyt jelző tábla kihelyezése	0	0	+	+
Monitorok, szenzorok használata a elszigetelés működtetésében	0	0	+	+
Keverők és szondák beépítése az aeroszol képződés ellen	0	0	M	M
Személyi fertőtlenítő készülék	0	0	0	+
Légzár a bejáratokon	0	0	0	+
Különböző nyomású szobák	0	0	0	+
Speciális légtechnika (HEPA szűrő)	0	0	0	+

# Biotechnológiai Tudomány Szervező Bizottság (BSCC)

- 1986-ban a Fehér Ház elfogadta a „Keretegyezmény a Biotechnológia Szabályozására” dokumentumot, mely a bizottság segítségével készült el
- Feladata: a szervezettség fenntartása (jog, tudomány, politika)
- Testületei:
  - ❖ Amerikai Földművelésügyi Minisztérium (USDA)
  - ❖ Egészségügyi és Szociális Minisztérium felügyelete alatt álló Élelmezési és Gyógyszerügyi Hivatal (FDA)
  - ❖ Amerikai Környezetvédelmi Hivatal (EPA)
  - ❖ Nemzeti Tudományos Alap (NSF)
- az NSF és a NIH igazgatósága vezeti

# BSCC céljai

- szervező szerepe
- felismerni és azonosítani a műszaki és tudományos problémákat
- megegyezés a szövetségi hivatalok között
- együttműködés az eljárások és értékelések felülvizsgálatában
- műszaki és tudományos kérdésekben együttműködés
- általános ajánlásokat visszatérő helyzetekre
- biotechnológiai tanulmányok elősegítése és koordinálása

# Keretegyezmény a Biotechnológia Szabályozására

- a szabályozás alapelve a tudományos megalapozottság és a kockázati tényezők (veszély, megelőzés)
- A felügyeleti és az irányító hatóságok az FDA, EPA, és az USDA lettek
- Elvek:
  - ❖ a hagyományos génmutációs technológiák gyakorlati szabályozását alkalmazzák TGO esetén is
  - ❖ általánosan elfogadott és ismert definíciók egyeztetése és alkalmazása TGO-ra is
  - ❖ egymás kölcsönös ellenőrzése és felülvizsgálata
  - ❖ a termék használatának felelőssége egyetlen szervezetet terhel
- Összhangban van a szintén 1986-ban megjelent „Rekombináns DNS Technológiák Biztonsági Megfontolásai” dokumentummal (Gazdasági Együtműködési és Fejlesztési Európai Szervezet (OECD))

- Szabályozást igénylő organizmusok 2 kategóriája:
  1. más fajból származó génszakasz inzertálásával készített organizmus
  2. patogén mikrobák, vagy patogénből származó gént hordozó organizmus
- Felülvizsgálat alól mentesül: nem tartalmaz az emberre vagy a természetre veszélyes szekvenciát
- EPA és az USDA szabályozza az transzgénikus organizmusok mezőgazdasági használatát
- Jövő: a BSCC-nek sokkal nagyobb és proaktívabb szerepe lehetne, ha összehangolná a tudományos és a politikai vonatkozását a TGO-knak.

# TGO szektorspecifikus engedélyezése az USA-ban

Termék	Hivatal			
	FDA	EPA (TSCA)	USDA	OSHA
Humán gyógyszer	+	+		+
Feldolgozott élelmiszer	+	+	+	+
Biorovarírtó		++		+
Állatgyógyászati készítmény	+	++	+	+
Növény		+	+	+

NIH irányelvének megvalósítása önkéntes , nincs engedélyező hatásköre

EPA TSCA: Toxic Substances Control Act



# FDA: *Food and Drug Administration*

- közegészségügyért, az élelmiszerbiztonságért, gyógyászati ipari készítmények törzskönyvezéséért, felülvizsgálatáért felelős szervezet
- a biotechnológián belül:
  - gyógyszer (vérkészítmények is), élelmiszer, élelmiszer-adalékanyagok és színyanyagok, kozmetikumok, takarmány kiegészítők, állatgyógyszerek
- hatásköre: termékbiztonság, terméktisztaság, termékhatékonyság

# TGO szektorspecifikus engedélyezése az USA-ban

Termék	Hivatal			
	FDA	EPA (TSCA)	USDA	OSHA
Humán gyógyszer	+	+		+
Feldolgozott élelmiszer	+	+	+	+
Biorovarírtó		++		+
Állatgyógyászati készítmény	+	++	+	+
Növény		+	+	+

# EPA: *Environmental Protection Agency*

- Víz- és levegő, rovarirtók, gyomirtók, vegyszerek területén felügyel
- Hagyományos és TGO-val előállított biopeszticidok
- TSCA (Toxic Substances Control Act)
- Gyártásba kerülés előtt vizsgál és regisztrál, a termék minden fázisában ellenőriz
  - K+F, szabadföldi tesztek, gyártás, terjesztés és végfelhasználás
  - Kockázatelemzés
- Bioremediáció, bioleaching, N-fixálás a mezőgazdaságban, vegyszer előállítás, peszticidok előállítása

# PMN: Pre-Manufacture Notification

- Minimum 90 nappal a gyártás előtt el kell küldeni
- Információk a biobiztonságról és biocontainment-ről:
  - Mikroorganizmus jellemzése
  - Termék azonosítása
  - Biztonságirányítás
  - Egészségügyi és biztonsági adatok, stb.
- TSCA hatása az USA-n túl is kiterjed
- A TGO-k környezeti használatánál már a tesztelés előtt el kell küldeni
- Nem tér ki a TGO szennyvizére és levegőjére

# TGO szektorspecifikus engedélyezése az USA-ban

Termék	Hivatal			
	FDA	EPA (TSCA)	USDA	OSHA
Humán gyógyszer	+	+		+
Feldolgozott élelmiszer	+	+	+	+
Biorovarírtó		++		+
Állatgyógyászati készítmény	+	++	+	+
Növény		+	+	+

# USDA: *U. S. Department of Agriculture*

- Élelmiszeripar, mezőgazdaság, természeti erőforrások felügyeletéért felelős hivatal
- Már meglévő szabályozást használja a rekombináns technológiák esetén.
  - NIH irányelveiből
  - USDA mezőgazdasági és erdészeti előírásai
    - Kutatás, kezelés, szállítás, import szabályozása
- Animal and Plant Health Inspection Service: minden vírus, szérum és toxin előállítása és szállítása szigorúan ellenőrzött és engedélyhez kötött.
- Az engedélyezés eseti bírálaton alapul.
- USDA Biotechnológiai Kutatások Irányelveinek meg kell felelni

# TGO szektorspecifikus engedélyezése az USA-ban

Termék	Hivatal			
	FDA	EPA (TSCA)	USDA	OSHA
Humán gyógyszer	+	+		+
Feldolgozott élelmiszer	+	+	+	+
Biorovarírtó		++		+
Állatgyógyászati készítmény	+	++	+	+
Növény		+	+	+

# OSHA: *Occupational Safety and Health Administration*

- Személyzet védelme a munkavégzés környezetében
  - Épület
  - Eszközök használata közben
  - Vegyszerek, toxikus anyagok használatakor
  - Mikrobiális ágensekkel szemben
- A biotechnológiai ipar veszélyességét nem különbözteti meg a többitől → a meglévő szabályozást használja



# Nemzetközi szabályozás

- U.S. Department of Commerce, National Technical Information Service összefoglalása (*Review and Analysis of International Biotechnology Regulations, 1986*)
  - Szabályozások és irányelvek mennyiségében és típusában jelentős eltérések vannak.
  - A hivatalok nagyban támaszkodnak az iparbeli szakértőkre és akadémikusokra.
  - Észrevehető trend az rDNS kutatást érintő irányelvek folyamatos lazulásában.
  - A már meglévő környezetvédelmi és termékminőségi irányelvekre való alapozás preferált.
  - A szabályozás alakulásában az egészségügy a döntő húzóerő.

# OECD: *Organisation for Economic Cooperation and Development*

- **Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet**
- 1986 *Committee for Scientific and Technological Policy: Recombinant DNA Safety Considerations* jelentés
  - Technológia: kockázatelemzés, biztonsági intézkedések
  - Biocontainment alapelvek rDNS üzemi léptéknél
  - Tudományos megfontolások: környezeti és mezőgazdasági TGO és termékek alkalmazásánál
  - Üzemi léptékű gyakorlatban való TGO alkalmazás kritériumait meghatározták (GILSP)

# Transzgénikus mikroorganizmusok GILSP követelményei az OECD-ben

## Gazdaszervezet

- Nem patogén
- Nem fordulhat elő ágens
- Biztonságos ipari használatáról van feljegyzés
- Környezetben limitált túlélés és károkozás
- Technológiai körülmények között optimális növekedés

## Vektor/ inszerció

- Teljesen ismert, nem tartalmaz káros szekvenciát
- Minimális funkcionális DNS régió. Nem lehetséges a túlélés javulása (kivéve, ha a funkcióhoz lényeges).
- Kevéssé mobilizálható, stabil legyen
- Képtelen olyan antibiotikum rezisztenciát továbbítani, mely természetesen nem alakulna ki a mikrobákban.

## rDNS szervezet

- Nem patogén
- Az ipari jellemzői a szülőével megegyezők, de gyengültek a környezetben való túléléshez.

# OECD, Európa

- Európai Gazdasági és Szociális Bizottság: Javaslat európai parlamenti és tanácsi irányelvre a géntechnológiával módosított mikroorganizmusok zárt rendszerben történő felhasználásáról, 1988
- Az Európai Unió a NIH-vel megegyező biosafety szinteket határozott meg egy 1990-es direktívában
- Európai Bizottság 2002-es Akciótervében a biotechnológiára is vannak irányelvek

# Összefoglalás

- A kezdetben a NIH irányelvek viszonylag óvatosak voltak.
- Egyre több rDNS technológia, egyre több tapasztalat.
- Főként az üzemi léptékű gyógyászati termékgyártási, és biomezőgazdasági tapasztalatok után az irányelvek lazítása következett.
- Az USA és egyéb országok közti hasonlóságok megjelennek a szabályozásban. Eltérés leginkább a végrehajtásban van, technológiában nem.
- Törekvések a nemzetközi összehangolásra.

# Kérdések

- Mit jelent a biocontainment és miért alakult ki ez a fogalom?
- Mik az alapvető elhatárolási elvek a NIH irányelve szerint, mely alapján meg lehet gátolni a TGO-k kiszabadulását (3 féle gát)
- Az USEPA a termék mely fázisában felügyel?
- Miért fontos kockázatelemzést végezni az rDNS technológiás termékek gyártásba kerülése előtt?
- Miért lazultak a biocontainment szabályozó irányelvek az utóbbi években?

**Köszönjük a megtisztelő  
figyelmet!**