

САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРАВИЛА
«БЕЗОПАСНОСТЬ РАБОТЫ С РЕКОМБИНАНТНЫМИ
МОЛЕКУЛАМИ ДНК»

Дата введения 1 июля 1989 г.

утверждены заместителем министра здравоохранения СССР,
Главным государственным санитарным врачом А.И. КОНДРУСЕВЫМ
18 января 1989 г.

Введение

Опыт работы с рекомбинантными ДНК, охватывающий полтора десятилетия, позволил более трезво оценить степень опасности, которую они представляют для персонала, имеющего с ними дело, и для окружающей среды. Этот опыт ясно показал, что первоначальные представления преувеличивали опасность рекомбинантных ДНК, и эти взгляды были пересмотрены в сторону более умеренных оценок. Но развитие работ с рекомбинантными ДНК поставило новые вопросы и привело к необходимости принять решения, отвечающие возникшей ситуации. Технология рекомбинантных молекул ДНК находит сейчас применение в изучении патогенных микроорганизмов, предпринимаемом в интересах лечения и профилактики инфекционных болезней человека и животных. Она используется при получении нового поколения промышленных микроорганизмов, служащих для производства фармацевтических препаратов, антибиотиков, аминокислот, ферментов и других продуктов. Таким образом, возникли новые рекомбинантные системы, проложившие путь в промышленное производство, с которым не имели дело на первых шагах развития технологии рекомбинантных ДНК.

Более острым стал вопрос о защите окружающей среды в связи с промышленным производством, в котором используются рекомбинантные системы микроорганизмов. Возникла необходимость выработать позицию в отношении растений с генетической программой, измененной применением технологии рекомбинантных ДНК. Неясно, каковы будут последствия их внедрения в окружающую среду, когда возможности регулировать их распространение и эволюцию будут ограничены.

Все перечисленные обстоятельства вызвали необходимость создать новые правила работы с системами рекомбинантных ДНК, которые заменили бы устаревшие правила 1978 года («Временные правила безопасности работ с рекомбинантными ДНК» 1978 год).

При составлении настоящего документа были приняты во внимание правила 1978 г. и правила других стран, в первую очередь США (Guidelines for research involving recombinant DNA molecules. National institutes of Health Register 1986). При этом имелась в виду необходимость максимального приближения разрабатываемых правил к существующим в интересах объединения усилий всех стран в деле охраны здоровья людей и защиты окружающей среды.

1. Цель, содержание и применение

1.1. Правила регулируют получение и применение для целей исследования и производства рекомбинантных ДНК и систем их содержащих. Рекомбинантные ДНК в этих правилах понимаются как молекулы, полученные в лаборатории из природных источников и/или синтетическим путем, способные реплицироваться и экспрессироваться в клетке-хозяине. Под это определение подпадают и синтетические молекулы ДНК, имитирующие природных прототип.

Рекомбинантные молекулы ДНК как таковые не представляют никакой опасности. Но их введение в бактериальную, растительную или животную клетку приводит к созданию

новой живой системы, способной к существованию, размножению и деятельности, соответствующей ее генетической программе. Эти живые системы и являются объектом правил.

1.2. Цель правил состоит в обеспечении рациональных мер защиты работающего персонала, населения, сельскохозяйственного производства и окружающей среды от возможного вреда, связанного с созданием и распространением рекомбинантных организмов.

1.3. Настоящие правила являются обязательными для всех научных, промышленных и иных организаций СССР, проводящих исследования по рекомбинантным ДНК или использующих последние для производства и других целей. Министерства и ведомства обеспечивают выполнение правил в подчиненных им учреждениях.

Лица, допустившие нарушения этих правил, привлекаются к ответственности в соответствии с существующим законодательством СССР.

2. Меры безопасности

Предписанные этими правилами меры безопасности исходят из существующего или предполагаемого вреда систем вектор-хозяин (рекомбинантные системы), которые конструируются в научных учреждениях и применяются для тех или других практических целей. Степень опасности рекомбинантных систем зависит от инфекционности и токсигенности микроорганизмов, которые использованы для их конструирования, их способности к выживанию в окружающей среде и переносу в другие организмы содержащейся в них генетической информацией.

Основной принцип оценки потенциальной опасности генетических манипуляций состоит в том, что безопасными считаются манипуляции *in vivo* и *in vitro*, воспроизводящие в той или иной форме процессы модификации или обмена генетической информации, происходящие в природе. Генетические манипуляции, не имеющие природных аналогов и безусловно являющиеся вмешательством человека в естественный ход генетических процессов, требуют оценки и регулирования, хотя они могут быть совершенно безопасными.

Меры безопасности слагаются из приемов стандартной микробиологической практики, физической и биологической защиты.

2.1. К работе с рекомбинантными ДНК допускаются лица, прошедшие медицинский осмотр и получившие подготовку, которая предусматривает знание основ биологии организмов, с которыми предстоит работать, и приемов работы с ними. Подготовка должна быть подтверждена документально.

Вопрос о допуске к работе с рекДНК решается местной комиссией по рекомбинантным ДНК (см. 6.4). Неквалифицированный персонал не может быть допущен к работе с рекомбинантными системами.

2.2. Физические меры защиты (Ф, В1).

Предусматривает 4 уровня физической защиты.

2.2.1. I-й уровень (минимальный) – Ф1 (В1₁).

Эксперименты, требующие физической защиты I-го уровня, могут проводиться в лаборатории, предназначенной для работы с микроорганизмами 4-й группы с помощью известных и общепринятых микробиологических методов. Работа в этой лаборатории проводится на открытых поверхностях, без специального защитного оборудования. Лаборатория с I-м уровнем физической защиты не требует специальных инженерных устройств. В лаборатории должна поддерживаться строгая чистота. Приемы и хранение пищи, курение в этом помещении запрещены. Следует использовать только механические пипетки.

2.2.2. 2-й уровень (низкий) – Ф2 (В1₂).

Эксперименты, требующие физической защиты не требует специальных инженерных устройств. В лаборатории должна поддерживаться строгая чистота. Приемы и хранение пищи, курение в этом помещении запрещены. Следует использовать только механические пипетки.

Автоклав устанавливают в том же здании, где расположена лаборатория.

Режим и условия приборов, создающих опасность образования аэрозоля (смесители, водоструйные и прочие насосы, лиофилизаторы, ультразвуковые дезинтеграторы, качалки и т.п.), организуются таким образом, чтобы свести к минимуму поступления частиц аэрозоля в воздух помещения; рекомендуется использование боксов с ламинарным потоком воздуха или другие устройства физической защиты, сводящие к минимуму опасность утечки материалов. Используемые в опыте материалы, содержащие микроорганизмы, обеззараживаются. Во время работы на двери лаборатории вывешивается знак биологической опасности. Применяются все приемы, обязательные для Ф1.

2.2.3. 3-й уровень (средний) – Ф3 (В1₃).

2.2.3.1. Для экспериментов, требующих физической защиты 3-го уровня, необходима лаборатория, имеющая специальные инженерные конструкции и защитное оборудование. Лаборатория отделяется от прочих помещений дверями с блокировкой, обеспечивающими герметичность. Актотклав следует устанавливать в лаборатории. Поверхности стен, полов, столов и потолков должны легко очищаться и деконтаминироваться. Внутри лаборатории создается отрицательное давление. Воздух из лаборатории поступает за ее пределы по самостоятельным воздуховодам после предварительной очистки на фильтрах. Состояние воздуховодов и фильтров ежегодно проверяется работниками специальной ведомственной службы, что оформляется техническим актом.

2.2.3.2. На дверях лаборатории, оборудовании, контейнерах и материалах устанавливается знак биологической опасности (см. рис. 1). Им также помечаются клетки с животными или материалы, которые заражены живыми агентами, опасными с биологической точки зрения.

2.2.3.3. Вход в лабораторию разрешается только тем лицам, чье присутствие предусмотрено программой исследований и утверждено местной режимной комиссией.

2.2.3.4. Боксы с вытяжной вентиляцией и другое оборудование физической защиты должно использоваться во всех случаях, когда возможно образование аэрозоля с микроорганизмами. Не допускается рециркуляция воздуха. Применяется правило «Работа вдвоем».

2.2.3.5. Работающие должны пользоваться средствами индивидуальной защиты в соответствии с действующими нормами (1.1), утвержденными Госкомтруд СССР и ВЦСПС, и нормами бесплатной выдачи санитарной одежды и обуви, установленными министерствами и ведомствами.

2.2.3.6. Непосредственно после завершения экспериментов рабочие поверхности боксов и другого оборудования обеззараживаются.

2.2.3.7. Стеклопосуда, которая употреблялась при исследованиях, перед повторным использованием должна стерилизоваться непосредственно в лаборатории или помещаться в прочные герметичные контейнеры до удаления из лаборатории; эти контейнеры и их содержимое следует стерилизовать при повторном применении.

2.2.3.8. Вакуумные линии необходимо защищать фильтрами и ловушками для жидкости, которые периодически подвергаются техническому осмотру персоналом. Периодичность осмотра определяется местной режимной комиссией.

2.2.3.9. Допускается проведение экспериментов, требующих физической защиты уровня Ф3, в лабораториях, где создан направленный поток воздуха, но устройство вытяжной вентиляции не соответствует полностью уровню Ф3. Обязательным условием при этом является использование герметического бокса класса 3, снабженного вытяжной вентиляцией, фильтром и перчатками для манипуляций.

Все материалы до удаления из такого бокса должны стерилизоваться или помещаться в не разбирающиеся герметичные контейнеры, которые перед выносом из лаборатории обеззараживаются.

2.2.4. 4-й уровень защиты (высокий) – Ф4 (ВL₄).

Для работы с новыми (неизвестными в природе) и генетически измененными микроорганизмами, безусловно опасными для человека, животных и растений, должны быть созданы условия совершенно исключают загрязнение внешней среды и обеспечивающие полную безопасность работающего персонала. Эти условия создаются в лаборатории,

которая размещается или в отдельном здании или в полностью изолированном от других помещений отсеке общего здания.

Помещения лаборатории Ф4 имеют следующие инженерные особенности:

2.2.4.1. Монолитные стены, полы и потолки, в которых все технологические отверстия (воздушные каналы, электропроводка, трубопроводные коммуникации) герметизируются, чтобы обеспечить физическую изоляцию рабочего помещения и исключить возможность проникновения биоматериалов за пределы лаборатории.

2.2.4.2. Отдельную вентиляционную систему» поддерживающую отрицательное давление воздух.

2.2.4.3. Устройство для обеззараживания воздуха до выхода его в атмосферу.

2.2.4.4. Воздушные шлюзы, через которые могут безопасно доставляться в помещение предмета оборудования, посуда и животные материалы. Двери этих шлюзов необходимо блокировать при помощи механических или электромеханических устройств, исключающих их одновременное открывание.

2.2.4.5. Санпропускник, размещенный либо в основной здании, либо в отдельно стоящем здании, соединенным с производственными корпусами (лабораториями) закрытой галереей. В состав санпропускника входят душевые, гардеробы для домашней и рабочей одежды, кладовые грязной и чистой спецодежды.

2.2.4.6. Знак безопасности помещается на всех наружных и внутренних дверях, ведущих в индивидуальные лабораторные комнаты, где проводятся эксперименты.

2.2.4.7. Вход в лабораторию разрезается только тем лицам, чье присутствие предусмотрено программой исследований и утверждено местной режимной комиссией.

2.2.4.8. Эксперименты, требующие физической защиты Ф4, должны выполняться в боксах высшей степени защиты - герметичных боксах безопасности с вытяжной вентиляцией с фильтрами, которые позволяют, в случае необходимости, производить работу внутри бокса в перчатках. Доступ в эти боксы возможен лишь из рабочих помещений лаборатории. Все материалы до удаления из боксов стерилизуются или переносятся в неразбиваемые герметичные контейнеры, которые удаляются из бокса через химически обеззараживающий танк или автоклав.

2.3. Биологические меры защиты

Потенциальная опасность рекомбинантных ДНК зависит от инфекционности и токсигенности микроорганизмов, использованных при генетической манипуляции, от способности полученных рекомбинантных систем к выживанию в окружающей среде и к переносу генетической информации в другие организмы.

2.3.1. Все приемы, снижающие инфекционные свойства рекомбинантного организма, уменьшающие вероятность его выживания в окружающей среде и устраняющие возможность генетического переноса составляют меры биологической защиты. Рекомбинантная молекула ДНК и клетка-хозяин, куда она введена, рассматриваются при этом как единое целое (рекомбинантная система вектор-хозяин, ВХ-система). Потенциальную опасность системы ограничивают физическими мерами безопасности и использованием штаммов, не способных размножиться в окружающей среде, в организме человека и животных без искусственно создаваемых условий. Вероятность выживания в окружающей среде рекомбинантного прокариота микроорганизма понижают введением мутаций в клетку-хозяина, создающих ее ауксотрофность, как это сделано в случае *E.coli* K-12 χ 1 1776. Той же цели служат векторы, уменьшающие жизнеспособность системы. Вероятность передачи генетической информации ограничивают в этом случае устранением из системы факторов трансмиссивности, использованием векторов, происходящих из немобилизуемых плазмид, и таких бактериофагов, как харон-лямбда.

Установлено два уровня биологической безопасности: система ВХ1 – умеренной безопасности (НВ1), система ВХ2 – высокой безопасности (НВ2).

2.3.2. Стандартом системы ВХ1 является *E.coli* K-12 и ее производные с векторами на основе неконъюгативных плазмид (psCLOL, Cole4 и их производных) и бактериофаг лямбда.

2.3.3. Основным критерий системы ВХ2 состоит в том, что в условиях, имитирующих окружающую среду, выживает или передает генетическую информацию не более чем 1

рекомбинантная прокариотная клетка из 10^8 . Этот критерий не относится к растительным и животным клеткам. Пример клетки-хозяина, отвечающей требованиям и лямбда-хароны (с соответствующей клеткой-хозяином).

2.3.4. Рекомбинантные системы на основе *E.coli*, аспорогенной *Bacillus subtilis* и *Saccharomyces cerevisiae* и векторов в виде неконъюгативных плазмид и бактериофагов относятся к группе ВХ1 (на них не распространяются действия правил, см. 3.3.8.б).

2.3.5. Некоторые рекомбинантные системы, квалифицированные как ВХ1, ВХ2 перечислены в приложении 2.

2.3.6. Квалификацию системы как ВХ2 осуществляют Межведомственная комиссия по рекомбинантным ДНК при АН СССР. Исполнители, организации и местные комиссии не имеют на это права и обращаются для признания системы, отвечающей требованиям ВХ2, в названную комиссию через Центральную режимную комиссии Минздрава СССР.

2.5. Хранение, передача и транспортировка

Рекомбинантные системы, требующие уровня физической защиты Ф1, Ф2, Ф3, Ф4, хранятся, транспортируются и пересылаются в форме отдельной системы рекомбинантной ДНК и клеток-хозяев, так как рекДНК не представляют опасность сама по себе (см. 1.1.), а клетки-хозяева могут рассматриваться как обычные микроорганизмы в зависимости от их класса патогенности и рекДНК, которая в них будет вводиться.

3. Классификация работ с применением рекомбинантных ДНК по степени опасности

Рекомбинантная система, манипуляции с которой регламентируются настоящими правилами, состоит из клетки-хозяина (бактериальной, растительной, животной) и рекомбинантной ДНК, образованной в свою очередь вектором (плазмида, органелла, вирус) и клонируемой ДНК.

Степень опасности рекомбинантной системы зависит прежде всего от инфекционных и токсигенных свойств клетки-хозяина и рекомбинантной ДНК. Кроме этого, имеют значение вероятность ее выживания в окружающей среде и способность к передаче генетической информации другим организмам.

Практически безопасность работ по рекомбинантным ДНК обеспечивается сочетанием средств физической и биологической защиты.

3.1. Следующие рекомбинантные системы и процедуры допускаются только специальным решением Центральных режимных комиссий на основе заключения Межведомственной комиссии по рекомбинантным ДНК АН СССР.

3.1.1. Рекомбинантные ДНК, содержащие функционально активные гены токсина для позвоночных с LD_{50} менее 100 нанограмм на кг веса тела (например, ботулинический, столбнячный, дифтерийный токсины).

3.1.2. Клонирование систем вектор-хозяин, относящихся к группе патогенности 1.

3.1.3. Перенос гена(ов) в клетку-хозяина группы патогенности I ДНК организма, принадлежащего к группе II и III, если она содержит ген (фактор) патогенности.

3.1.4. Перенос гена(ов) в клетки человека.

3.1.5. Преднамеренное внесение в окружающую среду любых организмов, содержащих рекомбинантные ДНК.

3.2. Следующие рекомбинантные системы разрешает местная режимная комиссия с уведомлением Центральной режимной комиссии:

3.2.1. Клонирование генов токсинов и патогенности группы II и III в гетерологичных системах, иных чем *E.coli* K-12, *Saccharomyces*, аспорогенные штаммы *B.subtilis*.

3.3. Эксперименты и процедуры с микроорганизмами и их ДНК (бактерии, риккетсии, грибы, вирусы), относящимися к патогенам человека и животных класса 1, 2 и 3, должны быть обеспечены мерами физической и биологической защиты согласно 3.3.1., 3.3.2. и 3.3.3.

3.3.1. Векторы и клетки-хозяева принадлежат к патогенам класса 1, 2 и 3.

Класс патогенности	Ф (BL)	ВХ (HV)
1	4	2
2	3	2
3	2	1

3.3.2. Вектор принадлежит патогенным микроорганизмам класса 1, 2 и 3 клетка-хозяин непатогенна.

Класс патогенности	Ф (BL)	ВХ (HV)
1	3	2
2	2	2
3	2	1

3.3.3. Вектор и клетка-хозяин непатогенны, ДНК – из организмов класса 1, 2, 3.

Класс патогенности	Ф (BL)	ВХ (HV)
1	4	2
2	3	2
3	2	1

3.3.4. Меры безопасности для рекомбинантных систем, содержащих гены токсинов позвоночных, зависят от степени токсичности и других свойств этих агентов. В случае клонирования в *E.coli* K-12 меры безопасности будут следующими:

3.3.4.1.а. LD₅₀ токсина от 100 нанограмм до 1000 нанограмм – Ф2 +ВХ2 или Ф№ +ВХ1 (абрин, эпсилон токсин *Clostridium perfringens*).

3.3.4.1.б. LD₅₀ токсина от 1 микрограмма до 100 микрограмм – Ф1 +ВХ1 (альфа токсин и бета токсин *Staphylococcus aureus*, рицин, экзотоксин А *Pseudomonas aeruginosa*, токсин *B.pertussis*, мышинный токсин *Y.pestis*, нейротоксины змеиных ядов).

3.3.4.1.в. Токсин холеры, термолабильные токсины *E.coli* и *Yersinia enterocolitica* – Ф1 + ВХ1.

3.3.4.2. В случае других хозяев, а не *E.coli* K-12, меры безопасности устанавливаются Центральными режимными комиссиями по рекомендации Комиссии по рекомбинантным ДНК АН СССР.

3.3.5. Эксперименты (процессы), использующие патогенные вирусы для животных и человека класса 1 тканевой культуре, требуют физической защиты уровня Ф4, класса 2 – Ф3, класса 3 – Ф2. Для остальных вирусов достаточно Ф1.

3.3.6. Для следующих рекомбинантных систем достаточно условия Ф1.

а) рекомбинантные системы с растительными клетками в культуре;

б) рекомбинантные системы с животными клетками и векторами, происходящими из непатогенных для человека и животных источников;

в) лабораторные эксперименты с трансгенными растениями и животными.

3.3.7. Предельный объем культуры для лаборатории 50 л.

3.3.8. Правила не распространяются на рекомбинантные системы, состоящие из клетки-хозяина и рекомбинантной ДНК, происходящих из:

а) микроорганизмов одного вида или одной группы, внутри которой в природе происходит естественный обмен генетической информации;

б) микроорганизмов IV группы и непатогенных микроорганизмов (кроме случаев, оговоренных в пункте 3.2.3.), а также рекомбинантные системы *E.coli* K-12 с векторами на основе неконъюгативных плазмид, фагов лямбда и Ff; *Saccharomyces cerevisiae* и *S.varum*, аспорогенных штаммов *B.subtilis*.

4. Окружающая среда

Преднамеренное внесение в окружающую среду организма, обладающего рекомбинантными ДНК, требует размещения Центральной режимной комиссии Минздрава

СССР и/или Госагропрома СССР и заключения Межведомственной комиссии по рекомбинантным ДНК АН СССР.

5. Промышленность

Промышленное использование организма содержащего рекомбинантную ДНК, требует разрешения Центральной режимной комиссии Минздрава СССР.

Разрешение на использование рекомбинантных организмов на опытном производстве выдается местной режимной комиссией.

6. Функции и ответственность

6.1. Центральная режимная комиссия Минздрава СССР является высшим органом контроля всех исследований и промышленных производств, где применяются рекомбинантные молекулы ДНК в области медицины и микробиологической промышленности.

Центральная режимная комиссия Госагропрома несет те же функции в области ветеринарии, животноводства и растениеводства.

6.2. Межведомственная комиссия по рекомбинантным ДНК АН СССР является консультативным органом; она дает заключения для центральных режимных комиссий. Комиссия назначается Президиумом АН СССР по согласовании с ведомствами.

6.3. Местные комиссии по рекомбинантным ДНК, функции которых могут выполняться режимными комиссиями, назначаются директорами института (предприятия); они регистрируют работы по рекомбинантным ДНК и наблюдают за исполнением этих правил в институте (предприятии).

6.4. Директор института (предприятия) или уполномоченное лицо несет ответственность за выполнение настоящих правил в подведомственном учреждении.

6.5. Исполнитель работы сообщает Местной комиссии все необходимые сведения о работе и, в случае надобности, через дирекцию института (предприятия) обращается в Центральную режимную комиссию с просьбой о разрешении на проведение работы или уведомлением; он несет непосредственную ответственность за соблюдение этих правил.

6.6. Настоящие правила действуют на всех территории СССР и вступают в силу со дня опубликования. Центральные режимные комиссии по предложению Комиссии по рекомбинантным ДНК АН СССР при необходимости вносят в правила изменения и дополнения. Правила не ограничены сроком.

Введение данных правил отменяет все принятые ранее правила, регулирующие работы с рекомбинантными системами и их использование.

1.1. ГОСТ 12.1.008-76. Система стандартов безопасности труда. Биологическая безопасность. Общие требования, Москва. 1976 г.

1.2. Сборник отраслевых норм бесплатной выдачи специальной одежды, специальной обуви и других средств индивидуальной защиты рабочим и служащим микробиологической промышленности. Утв. 29 ноября 1985 г.

1.3. Положение о порядке учета, хранения, обращения, отпуска и пересылки культур бактерий, вирусов, риккетсий, грибов, простейших, микоплазм, бактериальных токсинов, ядов биологического происхождения. Утв. зам.министра здравоохранения СССР 18 мая 1979 г.

1.4. Инструкция о порядке получения, учета, хранения и выдачи, а также вывоза из СССР и вывоза из заграницы культур промышленных микроорганизмов (Минмедбиопром, АН СССР, 1987 г.).

СЛОВАРЬ

Биологическая защита – создание и использование в генетической инженерии безопасных векторов и клеток-хозяев, биологические свойства которых исключают выживание их в окружающей среде и передачу генетической информации.

Векторы – генетические структуры, полученные *ин vitro* из ДНК бактериофагов, плазмид, вирусов или иного источника, которые переносят в клетку чужеродную ДНК и обеспечивают репликацию и экспрессию последней в клетке-хозяине.

Генетическая инженерия – создание *ин vitro* биологически активных генетических структур с заданными наследственными детерминантами.

Рекомбинантная ДНК – молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты, полученная соединением *ин vitro* фрагментов ДНК, принадлежащих к разным биологическим видам, в естественных условиях не обрезающих таких гибридных молекул, или относящихся к одному и тому же виду, искусственно соединенных в структуру с необычным сочетанием генетических элементов. Этот термин в настоящих правилах относится к биологически активным рекомбинантным молекулам, способным реплицировать в клетке-хозяине в составе хромосомы или в виде автономной структуры.

Рекомбинантная система – живая бактериальная, растительная, животная клетка и введенная в нее рекомбинантная молекула ДНК, рассматриваемые как единое целое. Также – система вектор-хозяин (ВХ система).

Система вектор-хозяин – см. рекомбинантная система.

Трансформированный микроорганизм – микроорганизм, в который введена лабораторным путем рекомбинантная ДНК.

Физическая защита – создание и использование специальных защитных средств, приемов и устройств, предотвращающих распространение биологических агентов в окружающем пространстве.

Хозяин – клетка, включившая искусственно внесенный генетический материал, состоящий из рекомбинантной ДНК.