



## **Lecția 8. IZOLARE SI ALTE PRECAUȚII PRIVIND ACTIVITĂȚILE CU ORGANISME MODIFICATE GENETIC ÎN CONDIȚII DE LABORATOR**

### **Conținut:**

- 1. Tehnici și practici pentru activitățile cu microorganisme/  
organisme modificate genetic**
- 2. Evaluarea hazardului asociat cu OMG**
- 3. Tulpini de microorganisme utilizate în obținerea MMG.  
Bariere biologice de izolare**

# 1. TEHNICI ȘI PRACTICI PENTRU ACTIVITĂȚILE CU MICROORGANISME/ ORGANISME MODIFICATE GENETIC

*În conformitate cu Legea privind securitatea biologică (națională), sunt 4 clase de risc pentru activitățile cu **microorganisme/ organisme modificate genetic** în sisteme **izolate** în funcție de gradul de pericol potențial pentru sănătatea umană și mediu*

- ❑ **clasa I:** activități cu risc neglijabil, comparabil cu riscul de utilizare a microorganismelor nepatogene, sau fără risc
- ❑ **clasa II:** activități cu risc scăzut, comparabil cu riscul de utilizare a microorganismelor convențional patogene
- ❑ **clasa III:** activități cu risc moderat, comparabil cu riscul de utilizare a microorganismelor potențial capabile să transmită infecții
- ❑ **clasa IV:** activități cu risc agravat, comparabil cu riscul de utilizare a microorganismelor capabile să propage infecții foarte periculoase

**Izolarea este asigurată prin** materiale și echipament de izolare primară și secundară și prin respectarea Codului de practici în laboratoarele biologice (tehnici, igiena și securitatea la locul de muncă).

Asocierea clasei de risc  
agentului biologic

**Stabilirea măsurilor de precauție și  
cerințele minime necesare nivelului  
de izolare și protecție (Nivele de  
biosiguranță)**

- Patogenitatea agentului și doza minimă la care apar semnele de infecție
- Consecințele potențiale ale expunerii
- Calea de infecție în condițiile mediului natural
- trasee de infecție, care rezultă din manipulările de laborator (parenterală, aeriene, ingestie)
- Stabilitatea agentului în mediul înconjurător
- Concentrația agentului infecțios
- Prezența unei gazde adecvate (umană sau animală)
- Studii epidemiologice și rapoarte de infecții dobândite în laborator
- Disponibilitate unei profilaxii sau intervenții terapeutice urgente în caz de accident
- Tehnici de laborator (sonicare, generare de aerosoli, centrifugare, etc.)

## PRECAUȚII SPECIFICE ACTIVITĂȚILOR ÎN LABORATOR CU MMG

- Aplicarea barierelor de protecție (mănuși, halate, ochelari de protecție);
- Practici și proceduri cu nivelul 2 al biosiguranței;
- Transportul materialului biologic în conformitate cu reglementările în vigoare la nivel național și/sau internațional.

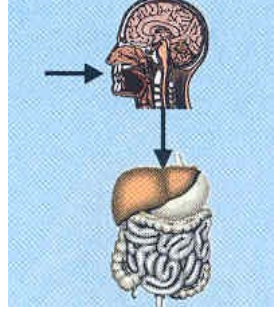
# TRASEE DE INFECȚIE ÎN LABORATOR

Inhalarea aerosolilor

Ingerare - nerespectarea regulilor de igienă

Expunere parenterală - pătrunderea accidentală prin piele (răni, înțepături, mușcături)

**Țesut conjunctiv** (inclusiv ochii, interiorul gurii și nasului etc.); ochiul fiind foarte vascularizat reprezintă o cale importantă de contaminare.



## MĂSURI DE PRECAUȚIE PRIVIND EVITAREA CONTAMINĂRII DIRECTE PRIN PIELE, OCHI SAU INGESTIE

### Strict interzis:

Consumul de alimente

Fumatul

Depozitarea produselor alimentare în laboratoare

Aplicarea produselor cosmetice (machiaj)

Mâinile potențial contaminate trebuie să fie ținute departe de față, gură, ochi etc.

Nu se recomandă ca stilouri, creioane, gumă de mestecat sau alt obiect prezent în laborator să fie „introdus în gură”

Mâinile trebuie să fie spălate minuțios cu apă și săpun timp de 30 secunde cât mai frecvent posibil, inclusiv și după dezbrăcarea mănușilor. Se usucă cu șervețele de unică folosință sau cu aer cald

# Echipamentul și Vestimentația de Protecție personală, EPP

## Laboratorul cu nivelul 1 și 2 de biosiguranță

- Capotele, halatele, mănușile corespunzătoare sunt obligatorii, acestea se păstrează separat în dulapuri prevăzute
- Ochelarii de siguranță, ecranele faciale ocazional – protecție față de sursele de radiații artificiale ultraviolete
- Este interzis a purta EPP în afara laboratorului, de exemplu în cantine, cafenele, birouri, biblioteci etc.
- Nu se poartă încălțăminte în care degetele nu sunt protejate

## Laboratorul cu nivelul 3 de biosiguranță

- EPP trebuie să fie complet - halate de jur împrejur, încheiate la spate, piese de acoperire a capului și, dacă este cazul, huse pentru încălțăminte sau pantofi speciali.
- Îmbrăcămintea de protecție de laborator trebuie să fie decontaminată înainte de a fi spălată.

## Laboratorul cu nivelul 4 de biosiguranță

- Schimbarea completă a îmbrăcămintei și încălțăminte este necesară, înainte de intrarea și la ieșirea din laborator.

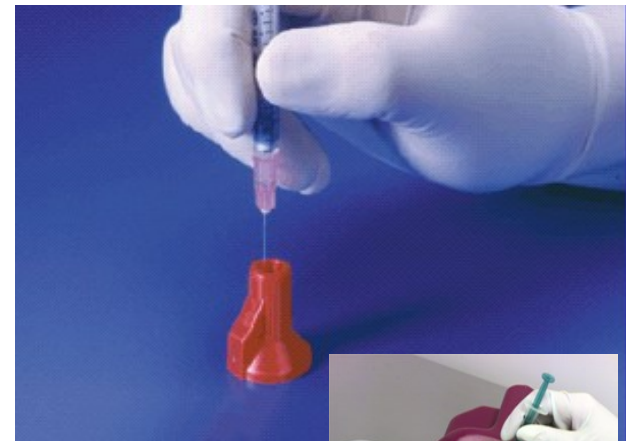
# Reguli de utilizare a pipetelor și mijloacelor de pipetare

- ❑ Pipetarea se realizează cu pipete automate sau pipete înzestrate cu pară de cauciuc
- ❑ Materialele infecțioase nu se omogenizează prin aspirare și expulzare repetată
- ❑ Transferul de lichide se face prin contactul tip-ului (vârf) pe suprafața pereților interni ai eprubetei
- ❑ Lichidul nu se elimină forțat din pipete, picăturile rămase se înlătură odată cu tip-urile care nu se reutilizează
- ❑ Pipetele se decontaminează prin imersie completă într-un dezinfectant corespunzător
- ❑ Containerul prevăzut pentru eliminarea vârfurilor de la pipete trebuie să fie amplasat în cabina de siguranță biologică și nu în afara acesteia
- ❑ Prezența pe suprafața de lucru a unui material absorbant poate evita dispersia materialului infecțios în timpul pipetării; va fi eliminat ca deșeu cu hazard după utilizare



# Reguli de utilizare a acelor, seringilor și altor obiecte ascuțite

- ❑ Eliminarea/transferul acului contaminat la o altă seringă are loc cu ajutorul unui dispozitiv mecanic sau un forceps
- ❑ Un tampon umezit cu dezinfectant trebuie să fie plasat pe vârful de ac, atunci când este înlăturat aerul din seringă
- ❑ Utilizarea cabinei de siguranță în toate cazurile posibile
- ❑ Un recipient pentru obiecte ascuțite trebuie să fie amplasat aproape de zona de lucru
- ❑ Reducerea activităților care prevăd utilizarea de ace și seringi
- ❑ Acele nu se reutilizează și sunt eliminate ca deșeuri în recipiente impermeabile și rezistente la înțepături
- ❑ Se recomandă utilizarea pipetelor Pasteur din masă plastică în locul celor din sticlă



# Reguli de utilizare a omogenizatoarelor, agitatoarelor și sonicatoarelor

- ❑ Vesela de masă plastică, în special de politetrafluoroetilena (PTFE) este recomandată
- ❑ Omogenizatoarele, agitatoarele și sonicatoarele trebuie să fie acoperite de o carcasă din plastic transparent, detașabil (pentru dezinfectare)
- ❑ Protecție auditivă trebuie să fie prevăzută pentru persoanele care utilizează sonicatoare
- ❑ Recipientul malaxorului se va deschide în CBS, peste 1 min. cel puțin pentru a se așeza aerosolii. Se recomandă acoperirea malaxorului în timpul utilizării cu un prosop umectat în dezinfectant
- ❑ Râșnițele din material plastic sunt mai sigure și se recomandă utilizarea lor în CBS. Se supun decontaminării, după utilizare



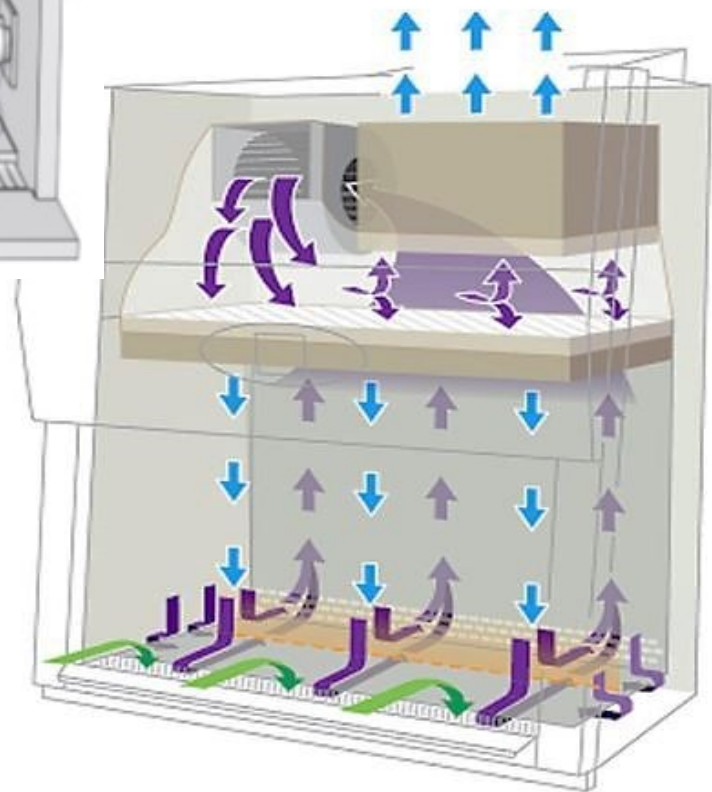
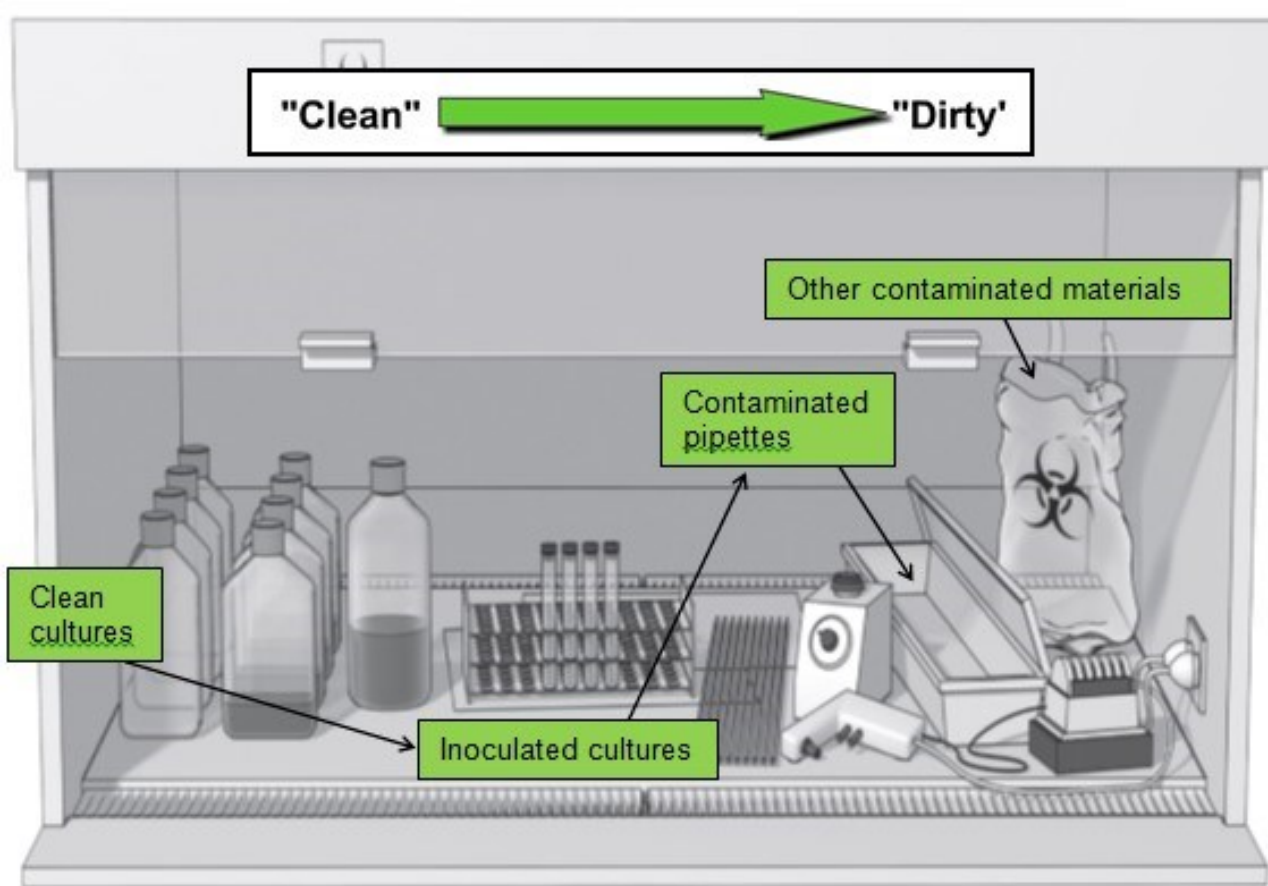


# Reguli de utilizare a CSB

- ❑ Panoul de sticlă frontal trebuie să fie închis în timpul efectuării experiențelor
- ❑ Numărul aparatelor/materialelor în interior trebuie să fie minim
- ❑ Grila din spate pentru exhaustarea aerului nu trebuie să fie blocată
- ❑ Ventilatorul trebuie să funcționeze timp de 5-10 min., înainte de începerea activității și după finalizarea acesteia
- ❑ Activitatea se efectuează la mijlocul suprafeței de lucru a CSB. Se recomandă mișcarea lentă a brațelor perpendicular la deschiderea frontală
- ❑ Manipulările asupra probei din interiorul CSB trebuie să înceapă cu 1 minut mai târziu (poate fi diferite intervale de timp în funcție de CSB ) după fixarea mâinii pe suprafața de lucru pentru a permite cabinei să ajusteze și să “înlătore” aerul de pe suprafața mâinilor
- ❑ Alte activități în apropierea imediată a CSB se reduc la minim.
- ❑ Suprafața de lucru a CSB se dezinfectează după finalizarea lucrului









Hood sash set above 18 inches.

- Excess storage of chemicals.
- Exhaust slots blocked.
- Containers stored within six inches of face of hood.



Hood set at 18 inches.

Exhaust slot

Minimum storage along the side wall.

## Reguli de utilizare a fiolelor ce conțin materiale cu biohazard

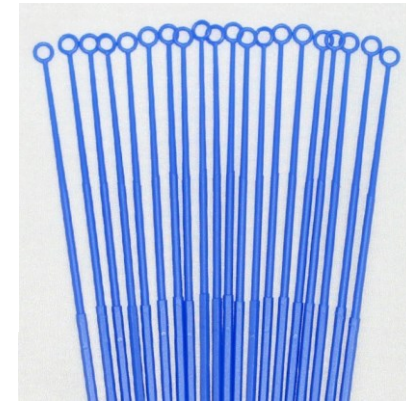
- Fiolele trebuie întotdeauna să fie deschise în CSB
- Preliminar deschiderii fiolei, se decontaminează suprafața externă a fiolei
- Fiolele sunt menținute în timpul operării lor în bumbac îmbibat cu alcool pentru a proteja mâinile în caz de spargere a eprubetei
- Se trasează un semn pe tub pentru a localiza poziția tamponului de bumbac sau de celuloză, dacă este prezent
- În cazul în care tamponul este mai sus de conținutul fiolei, se elimină cu un forceps steril
- Se adaugă atent lichid pentru resuspendarea conținutului fiolei

## Stocarea fiolelor care conțin materiale cu biohazard

- Se depozitează în faza gazoasă, în vase de congelare pe gheață uscată. Dacă sunt scufundate în azot lichid, acestea se pot sparge la scoatere din container
- E nevoie de precauție în momentul în care fiolele cu material liofilizat sunt deschise, conținutul poate fi sub presiune redusă și pătrunderea aerului poate cauza dispersia materialului în exterior

# Măsuri de precauție privind evitarea dispersiei materialului cu biohazard

- ❑ Ansele microbiologice de transfer a materialului biologic preferabil de unică folosință
- ❑ Ansele microbiologice de transfer a materialului biologic trebuie să aibă în diametru 2-3 mm iar brațul nu mai mult de 6 cm în lungime
- ❑ Se utilizează microincineratoarele electrice în defavoarea celor cu flacără deschisă
- ❑ Reziduurile cu culturile de microorganisme sunt introduse în saci de evacuare de laborator marcați cu bandă de control privind eficiența autoclavării.



Anse de inoculare de unică folosință Microspec™ din polistiren



# Reguli de utilizare a frigiderelor și congelatoarelor

❑Frigidererele, congelatoarele și lăzile de bioxid de carbon solid (gheață uscată) se decongelează și se curăță periodic

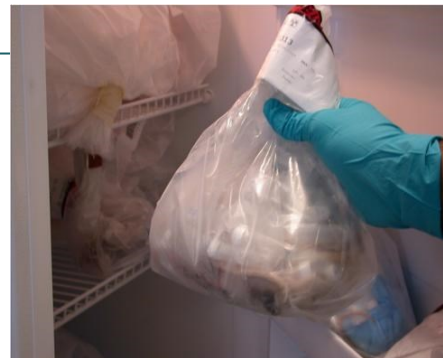
❑Toate recipientele depozitate în frigidere, etc. trebuie să fie etichetate cu denumirea științifică a conținutului, data depozitării și numele persoanei care le-a stocat

❑Materialele neetichetate și expirate trebuie autoclavate și eliminate

❑Un inventar al conținutului congelatorului trebuie să fie menținut



ThermoSafe 450 Dry Ice Storage



# Afișe biohazard



Afișe biohazard pe recipientele și unitățile de stocare (frigidere, congelatoare, incubatoare, recipiente de deșeuri, etc.).

Echipamentul contaminat și deșeurile periculoase trebuie să fie etichetat în același mod

În cazul în care sunt prezente mai multe biohazarduri, la alegerea semnului, riscul pentru om are prioritate față de pericolele pentru animale și plante





# Practici privind activitățile cu MMG/OMG în condiții izolate de laborator

## Laboratorul cu nivelul 1 și 2 de biosiguranță

- Evidența scrisă a accidentelor cu expuneri la materiale potențiale infecțioase
- Decontaminarea deșeurilor lichide, înainte de evacuare în sistemul de canalizare.
- Dotarea ferestrelor care se deschid cu ecrane de protecție contra artropodelor.
- Ambalarea și transportul materialelor conform regulamentelor naționale și/sau internaționale.

## Laboratorul cu nivelul 3 de biosiguranță

- Semnul internațional de avertizare al biohazardului cu indicarea unor condiții speciale pentru accesul în zonă, de ex., imunizarea
- Examenul medical obligatoriu pentru personalul de laborator
- Card de confirmare a angajării în instituție/laborator cu nivelul 3 de biosiguranță, va servi ca permis de acces în laborator

## Laboratorul cu nivelul 4 de biosiguranță

- Prezența strict obligatorie în laborator a cel puțin două persoane
- Personalul care primește și despachetează probele trebuie să fie conștient de riscurile de sănătate potențiale pentru a reacționa adecvat în situații de urgență
- O metodă de comunicare în situații de rutină și de urgență între personalul din laborator și personalul asistent din afara laboratorului.

## 2. EVALUAREA HAZARDULUI ASOCIAT CU OMG



Autorizație

Activități de utilizare a OMG în  
condiții izolate

Evaluarea riscurilor pentru sănătatea  
umană și mediu  
Clase de risc I- IV

NOTIFICARE

*Anexa nr. 1 Regulamentul privind autorizarea activităților legate de obținerea, testarea, utilizarea și comercializarea organismelor modificate genetic*

## NOTIFICAREA include informații despre:

- caracteristicile generale ale MMG: sursa ADN-ului; natura secvențelor de ADN inserate; gazda și vectorul; proteina care va fi produsă;
- clasa de risc în care este încadrată utilizarea activităților cu OMG în condiții izolate și măsurile de izolare;
- concluziile studiilor de evaluare a riscurilor pentru sănătatea umană și mediu;
- metodele de monitorizare și măsurile în caz de accident.

## AVIZUL Comisiei Naționale pentru Securitatea Biologică

Pozitiv

?

Negativ



# În evaluarea hazardului asociat cu OMG se analizează:

## **Gena inserată** (organismul donor) și produsul de expresie:

- ✓ Toxine
- ✓ Citokinine
- ✓ Hormoni
- ✓ Reglatori a expresiei genelor
- ✓ Factori de virulență sau enhanseri
- ✓ Secvențe de gene oncogene
- ✓ Rezistența la antibiotice
- ✓ Alergeni



**Nivelul de expresie suficient – produsul alogenei are activitate farmacologică/biologică potențial de a provoca daune?**

## **Receptorul / gazda**

- ✓ Susceptibilitatea gazdei
- ✓ Patogenitatea gazdei, virulența și producția de toxine
- ✓ Modificarea sușei- gazdă
- ✓ Statutul imun al receptorului
- ✓ Consecințele expunerii



## **Modificarea însușirii/gradului de patogenitate existentă/indusă ca rezultat al modificării genetice?**

- Există o creștere a capacității de infectare sau a patogenității?
- Poate o acțiune de silențiere în organismul recipient să fie anulată ca urmare a inserării genei străine?
- Codifică gena străină un determinant patogen de la un alt organism?
- În cazul în care ADN-ul străin include un determinant patogen, este previzibil că această genă ar putea contribui la patogenitatea OMG?
- Este disponibil un tratament?
- Va fi afectată sensibilitatea OMG la antibiotice sau alte forme de terapie ca urmare a modificării genetice?
- Este posibilă eradicarea organismelor modificate genetic?

## Certificarea identității microorganismelor

❑ Se caracterizează corect vectorul/insertul - structura și funcția în forma în care apare în MMG

❑ Se studiază relația taxonomică cu microorganismele înrudite, cunoscute și dăunătoare

❑ Se stabilește identitatea culturilor de celule și țesuturi eucariote în conformitate cu clasificările internaționale recunoscute:

❖ **Colecția Americană de Tipuri Celulare (ATCC, American Type Culture Collection)**

❖ **Federația mondială a colecțiilor de culturi (WFCC, World Federation of Culture Collections)**

❖ **Organizația europeană a colecțiilor de culturi (ECCO, European Culture Collection Organization)**

<http://www.atcc.org/>; [www.wfcc.nig.ac.jp/wfcc.html](http://www.wfcc.nig.ac.jp/wfcc.html); [wpcm.nig.ac.jp/hpcc.html](http://wpcm.nig.ac.jp/hpcc.html)

<http://www.eccosite.org/>

Se prezintă rapoarte ce atestă siguranța MMG în baza unor teste anterioare/date extrase din literatura.

### TESTE de confirmare a identității MMG

colorare specifică, microscopie electronică, serologie, profiluri nutriționale bazate pe utilizare sau degradare, izoenzime, proteine, G + C %, amprentele ADN/ARN, hibridizare secvențiere ADN/ARN.

## **Demonstrarea caracterului nepatogen are la bază următoarele informații:**

- tulpina de microorganisme prezintă o deleție stabilă de material genetic ce determină virulența
- prezintă mutații stabile recunoscute ca reduc suficient virulența demonstrată prin teste de patogenitate, analiză genetică
- se consideră riscul de reversie al unei mutații genice pentru orice eveniment de transformare ulterior
- evitarea utilizării unui vector/insert cu secvențe codificatoare pentru caractere dăunătoare în anumite microorganisme, chiar dacă nu conferă MMG final un fenotip susceptibil de a genera boli la oameni, animale și plante
- ceea ce este valabil pentru un organism gazdă nu se poate aplica automat și altor gazde. Fenotipul exprimat după inserția unui vector poate depinde de organismul receptor.
- materialul modificat genetic nu trebuie să fie autotransmisibil sau transferabil cu o frecvență mai ridicată decât cea a genelor microorganismului receptor sau parental.
- în cazul unei eliberări semnificative și neintenționate în mediu MMG nu trebuie să aibă efecte adverse, imediate sau întârziate asupra mediului.

### **3. MICROORGANISME UTILIZATE ÎN OBTINEREA MMG. BARIERE BIOLOGICE DE IZOLARE**

**Tulpinile receptoare de microorganisme utilizate în obținerea MMG pot fi:**

- ❑ Derivate de tulpini bacteriene suficient inactivate ("incapacitate"), a căror creștere și supraviețuire depinde de aportul de nutrienți doar în mediul de cultura și care nu sunt prezenți la om sau în mediul extern
- ❑ Tipuri sălbatice nepatogene cu nișe ecologice extrem de specializate, a căror diseminare accidentală ar avea un impact minim asupra mediului
- ❑ Tulpini foarte răspândite, dar inofensive, astfel încât o diseminare accidentală ar avea consecințe minime pentru om, animale și plante (de exemplu, bacteriile lactice, rizobacterii, extremo-termofile, bacterii sau fungi producători de antibiotice).



# Particularități de siguranță a unor vectori utilizați în transgeneză

Plasmida pUC18 este folosită frecvent ca vector de clonare în combinație cu celule de *Escherichia coli K12*.

- Plasmida pUC18 și derivatele sale sunt secvențiate integral.
- *E. coli K12* este lipsită de genele care conferă patogenitate, nu poate coloniza intestinul oamenilor sau al animalelor.

Experimentele de inginerie genetică cu *E. coli K12/pUC18* pot fi efectuate la **nivelul 1 de biosecuritate** cu condiția că produsele de expresie a ADN-ului străin inserat nu necesită niveluri de biosecuritate mai ridicate.



**Adenovirusurile** utilizate în transferul genelor nu conțin genele implicate în replicarea virusului, însă stocurile unor astfel de vectori pot fi contaminate cu virusuri capabile de replicare, generați prin evenimente de recombinare spontane, sau pot fi rezultatul purificării insuficiente. **Astfel, se recomandă ca acești vectori să fie manipulați la un nivel de biosecuritate similar celui atribuit adenovirusului din care sunt derivați.**



**Pentru virusurile din grupul 2 de risc utilizați pentru studiile de infectare sau transmitere la animale este recomandat nivelul 3 de izolare.**

De exemplu: *agenții grupului 3 de risc: virusul encefalomyelitelor venezueliene și febrei galbene trebuie să fie realizate la ????* de izolare în cazul experimentelor de infectare și modul de transmitere la animale.

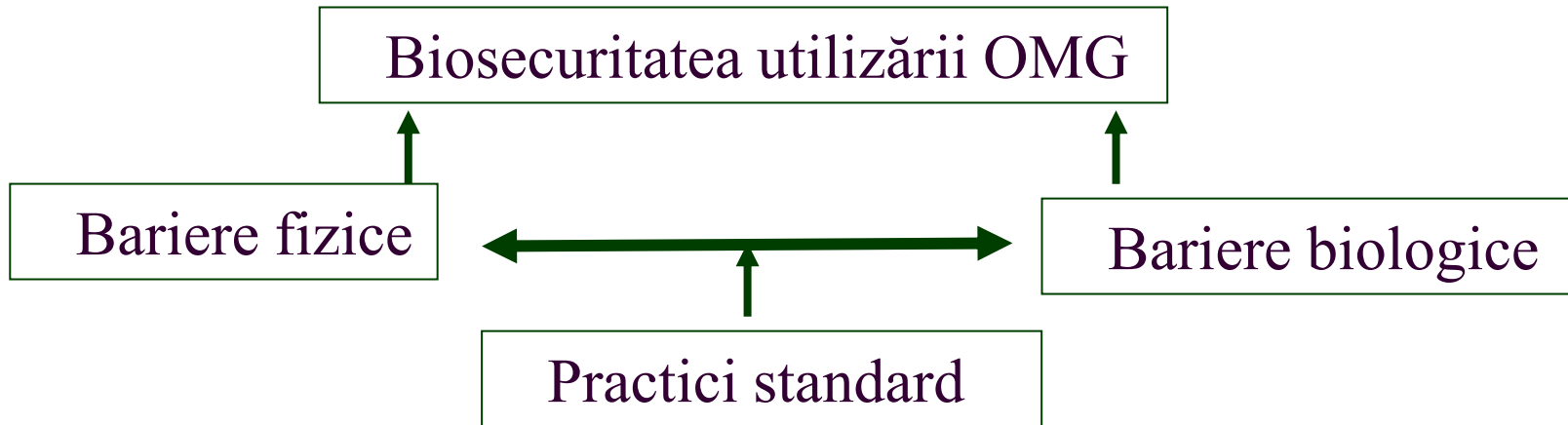


## **Concluzie:**

**niveluri superioare de biosecuritate sunt necesare atunci când:**

- Expresia ADN-lui derivat de la organisme patogene poate crește virulența OMG-ului**
- Secvențele de ADN inserate nu sunt bine caracterizate**
- Produsele genice au activitate farmacologică potențială**
- Produsele de expresie reprezintă toxine**

# Bariere biologice de izolare



**Vectorul recombinat și gazda în care este propagat în condiții de laborator - TOT ÎNTREG**

**Combinarea vector - gazdă → posibilități minime de "evadare"**

**?**

- supraviețuirea vectorului în gazda sa în afara condițiilor de laborator**
- posibilitatea transferului vectorului din gazda unde se multiplică la alte gazde prezente în mediul extern**

**Modificarea genetica nu trebuie sa crească stabilitatea OMG fata de non- OMG din mediu**

# Exemple de bariere biologice de izolare, procariote

**Sistemele certificate Gazdă-Vector de tip 1 asigură un nivel mediu de izolare.**

*Escherichia coli K-12 (EK1)* - gazdă în combinație cu vectori - plasmide non-conjugante - pSC101, Co1E1, variante de bacteriofagi, fagul lambda.

*Bacillus subtilis* (sușele/tulpinele RUB 331 și BGSC 1S53) cu următoarele plasmide-vectori: pUB110, pC194, pS194, pSA2100, pE194, pT127, pUB112, pC221, pC223 și pAB124.

**Sistemele Gazdă-Vector de tip 2 asigură un nivel ridicat de izolare biologică demonstrat prin teste de laborator.**

*Escherichia coli K-12 (EK2)* la care vectorul este o plasmidă, și tot acest tip de gazde la care vectorul este un fag.

**Eliberarea neintenționată a ADN-ului recombinat determinată de supraviețuirea organismelor sau de transferul acestuia la alte organisme trebuie să fie nu mai mult de **1 la 10<sup>8</sup>** celule - gazdă sau particule fagice în anumite condiții.**

***<https://www.oie.int/doc/ged/D5362.PDF>***

# Molecule de ADN recombinat care nu cad sub incidența unor reglementări internaționale stricte

Molecule de ADN recombinat care constau integral din secvențe de ADN de la:

- o singură sursă chiar dacă unul sau mai multe dintre acestea poate fi echivalente de sinteză chimică;
- o gazdă de origine procariotă, inclusiv plasmidele sau virusurile indigene ale acesteia, atunci când sunt multiplicare în gazdă dată (sau o tulpină foarte apropiată aceleași specii) sau atunci când sunt transferate la o altă gazdă prin căi fiziologice bine stabilite;
- o gazdă eucariotă, inclusiv cloroplaste, mitocondrii sau plasmide (cu excepția virusurilor), atunci când sunt multiplicare doar în gazda respectivă (sau o varietate foarte apropiată ale aceleași specii).

<https://www.youtube.com/watch?v=xGH3VzqtKiM&t=587s> (Biocontainment Laboratory Entry/Exit Procedure)

<https://www.youtube.com/watch?v=z2Dka1VC2PE> (Biosafety Level 3 Lab Entry)

<https://www.youtube.com/watch?v=xjwTwsN1hnU> (decontaminare reziduuri accidentale)

<https://www.youtube.com/watch?v=PwU5PEcFwbI> (Working in the BSL-4 laboratory: positive pressure suit)