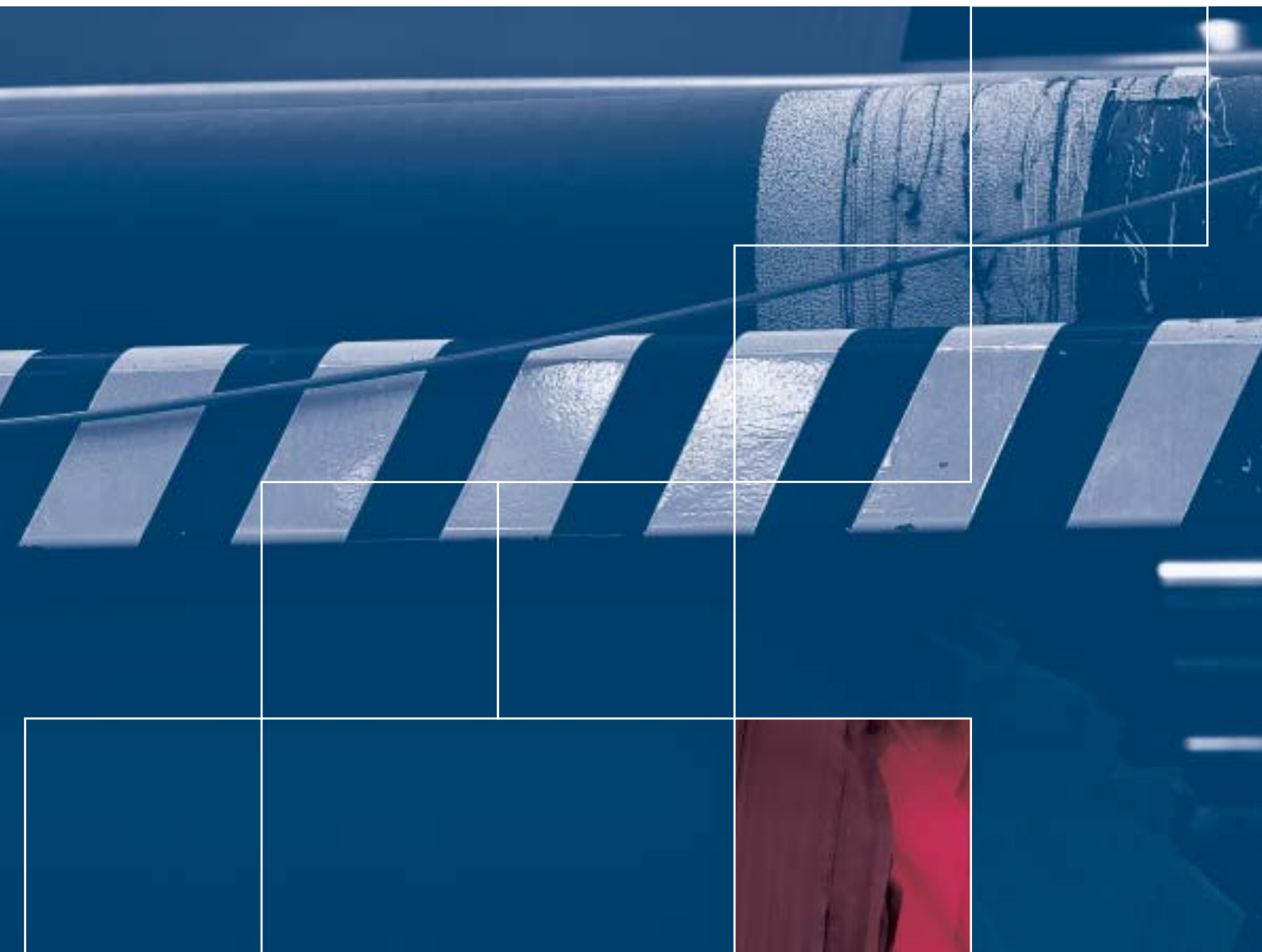


At-VEJLEDNING

STOFFER OG MATERIALER – C.0.5



Risikovurdering af
genteknologiske forskningsprojekter mv.

April 2001 – Erstatte At-anvisning nr. 4.6.0.1 af oktober 1990



Hvad er en At-vejledning?

At-vejledninger vejleder om, hvordan reglerne i arbejdsmiljølovgivningen skal fortolkes. At-vejledninger bruges til at

- uddybe og forklare ord og formuleringer i reglerne (lov og bekendtgørelser)
- forklare, hvordan kravene i reglerne kan efterkommes efter Arbejdstilsynets praksis
- oplyse om Arbejdstilsynets praksis i øvrigt på baggrund af bl.a. afgørelser og domme
- forklare arbejdsmiljølovgivningens områder og sammenhæng mv.

Tal i parentes henviser til listen over relevante At-vejledninger/-anvisninger/-meddelelser på bagsiden af At-vejledningen.

Er en At-vejledning bindende?

At-vejledninger er ikke bindende for virksomhederne, sikkerhedsorganisationerne eller andre, men vejledninger bygger på regler (lov og bekendtgørelser), der er bindende. Arbejdstilsynet vil ikke foretage sig mere i de situationer, hvor fx en virksomhed har fulgt en At-vejledning.

Virksomhederne kan vælge andre fremgangsmåder mv., men Arbejdstilsynet vil i så fald vurdere, om den valgte fremgangsmåde er lige så god og i overensstemmelse med reglerne.

Når en At-vejledning gengiver bindende metodekrav mv. fra lov eller bekendtgørelser, skal virksomhederne følge de pågældende metoder. Det vil altid fremgå tydeligt af en At-vejledning, når der gives bindende metodekrav mv.

Hvor findes information om At-vejledningerne?

Et emne kan være beskrevet i mere end én At-vejledning. Derfor er det en god idé at orientere sig på Arbejdstilsynets hjemmeside på Internettet på adressen www.arbejdstilsynet.dk.

I en overgangsperiode vil der stadig findes "gamle" At-meddelelser og At-anvisninger, der ligesom At-vejledningerne beskriver, hvordan arbejdsmiljølovgivningen kan overholdes. Med tiden vil alle At-meddelelser og At-anvisninger udgå, efterhånden som de afløses af At-vejledninger. Også her kan der hentes hjælp på Arbejdstilsynets hjemmeside.

Indhold

1. Generelt om risikovurdering	5
1.1. Procedure for risikovurdering	5
1.2. Indplacering af mikroorganismer i risikogrupper	6
1.3. Det overførte genetiske materiale	7
1.4. Sundhedsaspekter ved den endelige genetisk modificerede organisme	10
1.5. Miljøhensyn	11
1.6. Overvågningsteknikker	11
1.7. Valg af laboratorieklasser	11
2. Risikovurdering i praksis	12
2.1. Eksempler på projektyper	12
2.2. Eksempler på laboratorieklasser 1-projekter	13
2.3. Eksempler på laboratorieklasser 2-projekter	15
2.4. Eksempel på laboratorieklasser 3-projekt	16
3. Integrering af risikovurderingen i virksomhedens arbejdspladsvurdering	17
4. Ordliste	18

At-vejledningen beskriver den risikovurdering, der skal udarbejdes for alle genteknologiske projekter, forsøg og produktioner. Vejledningen omhandler kun risikovurdering af genetisk modificerede mikroorganismer, men en lang række af punkterne gælder også for genetisk modificerede dyr og planter. Vejledningen giver nærmere retningslinjer for, hvilke forhold ved det anvendte biologiske system der som minimum skal inddrages i risikovurderingen. Vejledningen kan ses som en uddybning af bilag 3a: "Vurdering efter § 6 af de biologiske systemer" og 3b: "Retningslinjer for risikovurdering" i bekendtgørelsen om genteknologi og arbejdsmiljø.

Bekendtgørelsen beskriver de enkelte punkter, der som minimum skal indgå, for at risikovurderingen er fyldestgørende. Det er en samlet vurdering af de biologiske systemers mulige farer for menneskers sikkerhed og sundhed samt for det ydre miljø. Ud fra risikovurderingen skal det bedømmes, hvilken klasse arbejdet skal udføres i.

Risikovurderingen skal være skriftlig, og der skal vedlægges en kopi til anmeldelsen af arbejdet. Sikkerhedsorganisationen skal medvirke til eller inddrages i udarbejdelsen af risikovurderingen.

Arbejdet med genetisk modificerede organismer (GMO'er) dækker al håndtering af disse organismer. Det vil fx sige forsøg, analyser, opbevaring og fremstilling af GMO'er. Der findes ingen nedre fortyndings- eller mængdegrænse for definitionen på GMO'er.

Risikovurderingen skal opbygges efter de retningslinjer, som står i bekendtgørelsen. Det gør det lettere for virksomheden, sikkerhedsrepræsentanten og Arbejdstilsynets tilsynsførende at undersøge, om alle punkter er gennemgået. Desuden er det langt hurtigere at ændre og ajourføre risikovurderingen, hvis den er opbygget efter de gældende retningslinjer.

At-vejledningen beskriver alene de generelle principper for risikovurdering, idet kombinationsmulighederne for vært, donor og overført genetisk materiale (gener, inserts og vektor) er utallige. Vejledningen viser ved eksempler, hvordan det er muligt at drage analoge slutninger om indplacering af arbejdet i de forskellige klasser.

At-vejledningen er opdelt i to hovedafsnit:

1. Generelt om risikovurdering, der beskriver de biologiske aspekter, der skal inddrages i en vurdering af eventuelle risici, og giver generelle retningslinjer for valg af klasse.
2. Risikovurdering i praksis, som giver eksempler på kombinationer af biologiske systemer, analyser af disse og den resulterende indplacering i klasse.

1. Generelt om risikovurdering

Ifølge bekendtgørelsen skal følgende forhold inddrages i vurderingen af mulige risici for menneskers sikkerhed og sundhed samt for det ydre miljø ved arbejdet:

- A. Sygdomsfremkaldende egenskaber ved de anvendte mikroorganismer for mennesker, dyr eller planter.
- B. Sundhedsskadelige egenskaber ved stoffer, som det overførte genetiske materiale medfører dannelse af, herunder allergene eller toksiske virkninger.
- C. Mulige sundhedsfarer ved arbejde med hele dyr og planter samt cellekulturer, herunder benyttede virus og virusfragmenter.
- D. Skadelige virkninger, der skyldes, at det er umuligt at behandle en sygdom eller at tilbyde en effektiv profylakse.
- E. Øvrige mulige sundhedsfarer ved alle dele af de benyttede biologiske systemer.
- F. Skadelige virkninger som følge af etablering i eller spredning til miljøet, fx ved transfer af insertet til andre organismer.
- G. Sandsynligheden for, at de potentielt skadelige virkninger opstår.
- H. Karakteristiske egenskaber ved det miljø, som sandsynligvis vil blive udsat i tilfælde af udslip.

Det er vigtigt at vurdere, om den genetiske modifikation kan påvirke værtsorganismens evne til at skade sundhed og miljø. Alvoren af eventuelle skader skal vurderes uafhængigt af sandsynligheden for, om skaderne faktisk indtræffer.

1.1. Procedure for risikovurdering

Første fase i vurderingsprocessen er at identificere eventuelle skadelige egenskaber ved det biologiske system (donor, vært, vektor og gener) og at indplacere GMO'en i en foreløbig klasse, klasse 1-4.

For at GMO'en kan blive en klasse 1-organisme, skal følgende være opfyldt:

1. Ingen af de anvendte organismer må forventes at kunne fremkalde sygdomme hos mennesker, dyr eller planter.
2. Det overførte genetiske materiale kan ikke give værtsorganismen en fænotype, så den bliver sygdomsfremkaldende.
3. Den endelige GMO må forventes ikke at kunne fremkalde sygdomme hos mennesker, dyr eller planter eller at få miljøskadelige virkninger.

Anden fase i vurderingsprocessen er en vurdering af sandsynligheden for, at der vil indtræde skadelige virkninger. Vurderingen omfatter både ansatte og det ydre miljø. Der skal tages hensyn til arten og omfanget af arbejdet samt til de indeslutningsforanstaltninger, der er knyttet til den foreløbige klassifikation af GMO'en, første fase.

Tredje fase er den endelige klassifikation af arbejdet og fastsættelse af de nødvendige indeslutningsforanstaltninger, som arbejdet kræver. Her er det specielt vigtigt at overveje, om arbejdet kræver specielle sikkerhedsforskrifter i forhold til dem, der er knyttet til klassifikationen af laboratoriet.

Herefter bør niveauet for menneskers og miljøets eksponering vurderes igen – det vil sige en fornyet gennemgang af risikovurderingen. Først da er risikovurderingsprocessen gennemført.

Arbejdstilsynet bør kontaktes, hvis der er usikkerhed med hensyn til indplacering i klasse – det vil sige den endelige klassifikation – og de nødvendige indeslutningsforanstaltninger.

1.2. Indplacering af mikroorganismer i risikogrupper

De eventuelle sygdomsfremkaldende egenskaber ved de mikroorganismer eller inserts, der skal benyttes i arbejdet, skal inddrages i risikovurderingen.

For at gøre det lettere er en lang række mikroorganismer placeret i risikogrupper.

Den gældende liste over gruppe 2-4-mikroorganismer, der er infektiøse over for mennesker, findes i bekendtgørelsen om biologiske agenser og arbejdsmiljø.

De fire risikogrupper definerer stigende grad af risiko for human sygdom:

1. En mikroorganisme, der efter al sandsynlighed ikke forårsager sygdom hos mennesker.
2. En mikroorganisme, der kan forårsage sygdom hos mennesker og være til fare for de ansatte. Der er lille risiko for spredning til omgivelserne, og der findes sædvanligvis effektiv forebyggelse eller behandling.
3. En mikroorganisme, der kan forårsage alvorlig sygdom hos mennesker og kan udgøre en alvorlig fare for de ansatte. Der kan være risiko for spredning til omgivelserne, men der findes sædvanligvis effektiv forebyggelse eller behandling.
4. En mikroorganisme, der kan forårsage alvorlig sygdom hos mennesker og udgør en alvorlig fare for de ansatte. Der kan være stor risiko for spredning til omgivelserne, og der findes sædvanligvis ingen effektiv forebyggelse eller behandling.

Risikogruppe 3 er underopdelt i to grupper: De egentlige risikogruppe 3-organismer, og dem, der er mærket med en asterisk (*). Asterisken betyder, at mikroorganismen i visse tilfælde kun udgør en begrænset smittefare for de ansatte, da den normalt ikke overføres via luften.

Ved genteknologisk arbejde med mikroorganismer, der ikke er nævnt i bekendtgørelsen om biologiske agenser og arbejdsmiljø, er det den ansvarlige forskningsleders opgave at foretage en forsvarlig indplacering af mikroorganismen. Der skal som minimum tages hensyn til følgende forhold i indplaceringen:

1. Mikroorganismens patogenicitet over for mennesker, dyr eller planter, herunder
 - forårsaget sygdom og patogenicitetsmekanisme, herunder invasivitet, virulens, infektionsvej og -sted
 - kommunikabilitet, transmissionsevne
 - infektiøs dosis
 - antibiotikaresistens
 - toksindannende egenskaber.
2. Mikroorganismens allergifremkaldende egenskaber.
3. Mikroorganismens kolonisationsevne.
4. Eksistensen af effektiv profylakse og behandling.

Kan en mikroorganisme, der ikke er nævnt i bekendtgørelsen om biologiske agenser og arbejdsmiljø, ikke med sikkerhed klassificeres i en risikogruppe, skal den foreløbigt klassificeres i den højeste risikogruppe blandt de grupper, der kan være tale om.

1.3. Det overførte genetiske materiale

Det fremgår af bekendtgørelsens bilag 3, at de potentielt skadelige egenskaber ved det overførte materiale og de stoffer, det medfører dannelsen af, skal inddrages i risikovurderingen.

Det overførte genetiske materiale dækker både inserts og vektorer, der skal bruges i arbejdet.

Det overførte genetiske materiale, det vil sige det rekombinante DNA, vil oftest indeholde to forskellige typer information: Der kan dels være tale om, at det overførte genetiske materiale koder for et produkt, normalt af proteinnatur, dels kan det genetiske materiale have en regulerende funktion. Begge typer af information vil hyppigt være til stede i den samme vektor. Herudover indeholder de fleste vektorer diverse selektionsmarkører, sædvanligvis gener for antibiotikaresistens.

Produkter

Ved risikovurderingen skal der især lægges vægt på, om det overførte genetiske materiale medfører dannelse af:

● Toksiner

I daglig tale bruges ordet toksin ofte som synonym for gift. Gifte er stoffer, der i mindre mængder kan være dødelige – især for pattedyr. I mere præcis betydning er en gift et stof, der i en given dosis kan udløse en skadelig effekt på en biologisk mekanisme, så den biologiske mekanismes funktion hæmmes, ødelægges eller i sjældnere tilfælde accelereres.

Toksiner er naturlige gifte, det vil sige stoffer, der er produceret af dyr, planter, bakterier eller andre organismer. Ordet bruges normalt ikke om syntetiske produkter.

I mikrobiologien skelnes mellem endo- og exotoksiner.

Endotoksiner er stoffer, der enten er en del af organismens/cellens struktur eller er intracellulære. Eksempler på endotoksiner er lipopolysaccharider (LPS), der er associeret med den ydre membran hos gram-negative bakterier, og β -1,3-glucaner hos visse skimmelsvampe. Begge stoftyper kan give alvorlige irritative lungeeffekter efter indånding af høje doser. LPS er desuden pyrogen og påvirker hjernens temperaturreguleringscenter ved blodforgiftning.

Exotoksiner er stoffer, som organismen (bakterien eller cellen) secernerer til omgivelserne. Mikrobielle exotoksiner er proteiner. Mange har enzymatisk virkning, der ødelægger vævet. Eksempelvis frigiver *Clostridium tetani* to toksiner, hvoraf det ene – tetanospasmin – giver spastisk lammelse af nerver til tværstribet muskulatur, og det andet – tetanolysin – er et enzym, der virker hæmolytisk.

Exotoksiner, der produceres af tarmpatogener og frigives i tarmen med virkning på tarmvæggen, kaldes enterotoksiner. Disse toksiner giver kvalme, diarré og opkastning. Toksinerne medfører voldsomme mavesymptomer ved sygdomme som kolera og dysenteri, men findes også ved mildere infektioner med *Salmonella* eller virulente coli-bakterier.

Toksiciteten for mange exotoksiner er bestemt ved deres LD50-værdi vurderet efter deres giftighed på vertebrater, især mus, rotter og kaniner. Oplysninger om et toksins LD50-værdi skal indgå i vurderingen af parental- eller recipient-organismer, der er kendt for at kunne producere toksiner.

● Biologisk højvirksomme stoffer

Her menes stoffer, der har signalfunktion i den menneskelige organisme, fx hormoner, lymfokiner, vækstfaktorer og proteiner fra visse onkogener.

Det væsentlige er at vurdere risikoen for genevoldende biologiske effekter, der kan være forbundet med, at et biologisk højvirksomt stof produceres og virker på forkert sted, forkert tidspunkt eller i forøget koncentration, herunder med mulighed for cellulær transformation.

Et eksempel på vurderingen er dannelsen af biologisk højvirksomt stof i en mikrobiel vært. Her skal der tages hensyn til organismens kolonisationsevne, evne til at overføre genetisk materiale til andre organismer og stoffets biologiske effekt, idet en eventuel kolonisering af værtsorganismen i tarmkanal eller luftveje må antages at kunne give anledning til en vedvarende lokal dosis af det pågældende stof. Det kan desuden være relevant at inddrage den normalfysiologiske koncentration af stoffet i vurderingen.

Et andet eksempel er arbejde i cellekulturer med protoonkogener og de onkogener, der opstår heraf. De er medvirkende i cellers vækst- og differentieringsmønster samt transformation. De vigtigste risici vil være, om vektoren (virus) har human specificitet, om der er hjælpervirus til stede, og – hvis der er – om den har samme værtsspecificitet som vektoren.

Desuden skal effekten af det biologisk højvirksomme stof samt udtryksstyrken af det tilsvarende gen vurderes.

I vurderingen af udtryksstyrken spiller særlige regulerende sekvenser, herunder stærke promotorer, en rolle.

Endelig skal man være opmærksom på, at gener for biologisk højvirksomme stoffer kan være konserverede gennem evolutionen. Derved kan stofferne fra andre organismer være aktive i mennesker, fx svineinsulin og c-ras fra gær.

● *Antibiotikaresistens*

Antibiotikaresistens betragtes her sammen med øvrige produkter. Vektorbåret resistens udøves via enzymatisk nedbrydning af antibiotikummet, fx beta-lactamase mod penicilliner og cephalospriner, acetyl transferase mod kloramfenicol og en lang række andre enzymer, der adenylerer, acetylerer eller fosforylerer stoffer.

Projekter, der indebærer overførsel af antibiotikaresistens, skal forhåndsgodkendes af Arbejdstilsynet, hvis overførslen kan bringe brugen af dette antibiotikum til behandling af sygdomme i fare.

Det er væsentligt at afgøre, om brugen af antibiotikaresistens kan have uheldige følger for bekæmpelse af smitsomme sygdomme. Det skal derfor vurderes, om den overførte antibiotikaresistens er rettet mod et af de præparater, der primært benyttes til at bekæmpe netop den organisme, hvori resistensen indføres. For eksempel vil det være uheldigt at indføre resistens mod penicillin i *Bacillus anthracis*, fordi penicillin er et af førstevalgs-præparaterne til bekæmpelse af miltbrand.

Når der bruges selektionsmarkører, kan det være muligt at udvikle og bruge vektorer med andre markører end antibiotikaresistens, fx evne til overvindelse af særlige vækstkrav for værtsorganismen.

● *Andet*

Produkter med andre eventuelle genevoldende effekter end ovennævnte, fx proteiner, der kan have allergifremkaldende effekter, eller mikrobielle virulensfaktorer, skal også inddrages i vurderingen.

Vektorer

Vektorer bruges til at indføre genetisk materiale i en værtsorganisme. Der er udviklet mange sammensatte vektorsystemer, som indeholder både plasmid- og viruselementer. Det er af betydning for vurderingen af den anvendte vektor, at man kender oprindelsen af de enkelte vektorelementer, det vil sige hvilke plasmid- og viruselementer der indgår i vektoren.

Vurderingen skal mindst indeholde følgende aspekter:

- Overførelsevne: Om vektorsystemet er konjugerbart eller non-konjugerbart. Det vil sige, om det genetiske materiale kan overføres til andre organismer end værtsorganismen.
- Værtsspecificitet: Hvilke organismer kan vektoren overføres til og udtrykkes i?
- Hjælpervirus: Er der hjælpervirus i værtscellen, hvorved det genetiske materiale kan spredes?

Da vektoren spiller en rolle i overførsel fra en organisme/celle til en anden, skal det vurderes, om det rekombinante genetiske materiale kan indføres eller integreres i de naturlige organismers genom, fx ved rekombination, konjugation eller hjælperfunktion.

Risikoen ved indførslen eller integreringen af det rekombinante genetiske materiale skal indgå i den samlede risikovurdering.

1.4. Sundhedsaspekter ved den endelige genetisk modificerede organisme

Risikovurderingen skal indeholde donor- og recipientorganismen, insert og vektor samt den endelige GMO's egenskaber. Væsentlige træk ved GMO'en, herunder stoffer, der dannes eller kan blive dannet som følge af den genetiske modifikation, er allerede beskrevet. En vurdering af den endelige GMO skal omfatte såvel sundheds- og miljøhensyn som beskrivelse af metoder til overvågning.

Vurdering af sundhedsaspekter ved den endelige GMO skal – ud over de nævnte forhold vedrørende værtsorganismen (se side 6) – indeholde følgende aspekter:

- Forventede toksiske eller allergene virkninger af GMO'en og dens stofskifteprodukter.
- Produktrisici, herunder dannelse af toksiner eller biologisk højvirksomme stoffer.
- Sammenligning mellem GMO'en og recipientorganismen – eller parentale organismer – med hensyn til patogenicitet.
- Kendte og forventede habitater.

Hvis organismen er patogen:

- Samme punkter som under recipientorganismen samt
- Mulig ændring af infektionsvej eller vævsspecificitet som følge af den genetiske modifikation.

- Mulighed for overlevelse uden for en mammal vært.
- Tilstedeværelse af vektorer eller andre udbredelsesmåder.
- Biologisk stabilitet.

1.5. Miljøhensyn

- Økosystemer, som organismen vil kunne undslippe til fra laboratoriet eller anlægget – den indesluttede anvendelse.
- GMO'ens forventede overlevelse, formering og spredning i de identificerede økosystemer.
- Forventet resultat af samspillet mellem GMO'en og de organismer, der vil kunne eksponeres i tilfælde af udslip til miljøet.
- Kendte eller forudsete virkninger for planter og dyr, såsom patogenicitet, toksicitet, allergenicitet, rask bærer af patogen, ændrede antibiotikaresistensmønstre, ændret tropisme eller værtsspecificitet og koloniseringsevne.
- Kendt eller forudset medvirken i biogeokemiske processer.

1.6. Overvågningsteknikker

- Teknikker til påvisning, identifikation og overvågning af GMO'en.
- Teknikker til påvisning af overførsel af det nye genetiske materiale til andre organismer.
- Mulige metoder til dekontaminering af området i tilfælde af udslip.

1.7. Valg af laboratorieklasser

Laboratorier, hvor der skal udføres genteknologisk arbejde, skal klassificeres af Arbejdstilsynet. Klassifikationen foretages i fire klasser. I klasse 1-laboratorier må der kun foretages arbejde af laveste risiko. Klassifikation til klasse 2, 3 og 4 stiller stigende krav til indretning og sikkerhedsforanstaltninger. Man kan læse mere om klassifikationer i Arbejdstilsynets vejledning herom. (1)

Klasse 1

Hvis det vurderes, at arbejdet ikke indebærer nogen – eller kun ubetydelig – risiko, skal det mindst udføres i laboratorieklasse 1.

Arbejde med mikroorganismer, der er indplaceret i risikogruppe 1, skal som hovedregel foregå i laboratorieklasse 1.

Klasse 2

Hvis det vurderes, at arbejdet indebærer en lav risiko, skal det mindst udføres i laboratorieklasse 2.

Arbejde med mikroorganismer eller inserts fra mikroorganismer, der er indplaceret i risikogruppe 2, skal som hovedregel foregå i laboratorieklasse 2.

Ved arbejde med biologisk højvirksomme stoffer skal man være særlig opmærksom på, at de samlede omstændigheder ved arbejdets udførelse ofte

kan gøre det nødvendigt, at arbejdet udføres en højere klasse end klasse 1.

Klasse 3

Hvis det vurderes, at arbejdet indebærer en moderat risiko for alvorlige eller potentielt dødelige sygdomme, skal det mindst udføres i laboratorieklasser 3. Projekterne skal forhåndsgodkendes af Arbejdstilsynet.

Arbejde med mikroorganismer eller inserts fra mikroorganismer, der er indplaceret i risikogruppe 3, skal som hovedregel foregå i laboratorieklasser 3.

Som udgangspunkt vil arbejde med en eukaryot viral vektor med højt udtryk af et biologisk højvirksomt gen-produkt skulle udføres i laboratorieklasser 3, hvis den virale vektor kan inficere humane celler, og hvis arbejdet samtidig involverer tilstedeværelsen af et hjælpervirus med samme værtsspecificitet.

Klasse 4

Hvis det vurderes, at arbejdet indebærer en høj risiko for alvorlige eller potentielt dødelige sygdomme, skal arbejdet udføres i laboratorieklasser 4. Projekterne skal forhåndsgodkendes af Arbejdstilsynet.

Arbejde med mikroorganismer eller inserts fra mikroorganismer, der er indplaceret i risikogruppe 4, skal som hovedregel foregå i laboratorieklasser 4.

2. Risikovurdering i praksis

Risikovurdering af et projekt skal følge de retningslinjer, der er beskrevet i bilag 3b i bekendtgørelsen om genteknologi og arbejdsmiljø. Eksemplerne i Atvejledningen dækker kun den foreløbige klassifikation af det biologiske system. I en endelig klassifikation skal man også inddrage andre forhold som fx det pågældende laboratoriums beliggenhed og allerede truffene foranstaltninger.

2.1. Eksempler på projektyper

Det er ikke alle aspekter, der er lige relevante ved vurderingen af forskellige projekter. Der kan skelnes imellem følgende hovedtyper af projekter:

- A. Overførsel af genetisk materiale fra mikroorganismer til andre mikroorganismer. Det væsentligste er at vurdere:
 - De anvendte mikroorganismers patogenicitet.
 - Hvor velkarakteriseret det overførte genetiske materiale er.
 - Tilstedeværelse af konjugative plasmider eller generelt transducerende fager i vært-vektor systemet.
 - Eventuelle genevoldende effekter ved gen-produkter.

Projekter, der involverer "shotgun"-kloning fra patogene til apatogene prokaryoter eller lavere eukaryoter, skal vurderes i henhold til den risikogruppe, som donororganismen er placeret i. Det skyldes, at det endnu ikke kan vides, om enkelte kloner har fået overført uønskede egenskaber. Der kan foretages nedklassificering ved senere subkloninger, eller hvis der arbejdes med velkarakteriseret materiale, der ikke koder for produkter med genevoldende effekter.

- B. Overførsel af genetisk materiale fra højere eukaryoter til mikroorganismer. De væsentligste vurderinger er i høj grad analoge med A:
- Den mikrobielle værts patogenicitet.
 - Hvor velkarakteriseret det overførte genetiske materiale er med hensyn til genevoldende effekter.
 - Tilstedeværelse af konjugative plasmider eller generelt transducerende fager.
 - Om det overførte genetiske materiale koder enten for proteiner, der kan have en effekt på humane celler udefra, eller for proteiner, der alene udøver en effekt, hvis de udtrykkes i den humane celle.
- C. Overførsel af genetisk materiale fra højere eukaryoter til cellekulturer fra højere eukaryoter inkl. genterapi. Det væsentligste er at vurdere:
- Om det overførte genetiske materiale koder for produkter med biologisk eller eventuelt patogen/toksisk effekt.
 - Promotorstyrke og eventuelt styrken af andre reguleringssekvenser.
 - Om den anvendte vektor/virus har human specificitet.
 - Om vektor/virus kan inficere eller transformere humane celler.
 - Om der er hjælpervirus til stede.

2.2. Eksempler på laboratorieklasser 1-projekter

1. titel: Fremstilling af humant *Adrenocorticotropisk* hormon (ACTH).

Vært: *Bacillus subtilis*, asporogen stamme.

Donor: cDNA bibliotek fra *Homo sapiens*.

Vektor: pUB110 samt stærk *Bacillus* promotor.

Insert: ACTH-genet.

Risikovurdering

Vært: *Bacillus subtilis* er ikke nævnt i bekendtgørelse om biologiske agensers liste. Asporogen *Bacillus subtilis* – en reversions frekvens for sporedannelse lavere end 10^{-7} – vurderes at tilhøre risikogruppe 1, eftersom risikoen for allergi er nedsat på grund af den manglende sporedannelse, og organismen er apatogen og subtilisinfri.

Donor: Donormaterialet stammer fra et humant cDNA bibliotek. Donormaterialet frembyder således ikke i sig selv nogen risiko.

Vektor: Vektoren pUB110 er ikke mobiliserbar i *Bacillus* og bærer ikke resistens over for antibiotika, der er rettet mod patogene *Bacillus*-arter.

Insert: Det overførte insert koder for ACTH af human oprindelse. ACTH er et proteinhormon og et biologisk højvirksomt stof, men det har kun effekt på binyrebarken.

Sundhedsaspekter ved den endelige GMO: Den endelige GMO vil kunne producere ATCH, men vil ikke kunne overføre insertet til tarmbakterier.

Klassificering

Der vil ikke kunne forekomme skadelige virkninger som følge af naturlig transfer af ATCH til andre organismer, og projektet kan derfor udføres i laboratorieklasser 1.

2. titel: Onkogen effekt i mammale celler.

Vært: 3T3 musecellelinje.

Donor: Abelson murine leukemia virus.

Vektor: pCGBP9.

Insert: Onkogenet abl.

Risikovurdering

Vært: Værten er en cellekultur fra en højerestående eukaryot og indeholder ikke endogene vektorer, der vil kunne mobilisere dele af det overførte genetiske materiale.

Donor: Abelson murine leukemia virus er et endogent retrovirus hos mus i naturen. Det kan inficere mus, rotter og hamstere, men ikke mennesker, og det kan ikke transformere humane celler *in vitro*.

Vektor: Vektoren pCGBP9 er en sammensat vektor med replikon fra *E. coli* ColE1 og fra Bovin papilloma virus. Ingen del af vektoren har human specificitet.

Insert: Onkogenet abl er et isoleret fragment og indeholder ikke virusstrukturproteingener, hvorfor viruspartikler ikke kan udvikles.

Sundhedsaspekter ved den endelige GMO: Onkogenet abl virker ikke eksternt på celler, da det biologiske system ikke indeholder elementer med human specificitet og derved ikke kan etableres i mennesker.

Klassificering

Onkogenprodukter er biologisk højvirksomme stoffer, og det giver anledning til at overveje, om projektet skal udføres i højere laboratorieklasser end klasse 1. Men da der ikke kan udvikles viruspartikler, kan projektet udføres i laboratorieklasser 1.

2.3. Eksempler på laboratorieklasser 2-projekter

3. titel: At rejse antistoffer mod tuberkulose-antigener.

Vært: *E. coli* K12.

Donor: *Mycobacterium tuberculosis*.

Vektor: pBR322.

Insert: Gener for *M. tuberculosis* antigener.

Risikovurdering

Vært: *E. coli* K12 er en velkendt laboratoriestamme, der erfaringsmæssigt har vist sig at være apatogen, bl.a. på grund af manglende koloniseringsevne.

Donor: *Mycobacterium tuberculosis* er en risikogruppe 3-organisme, jf. bekendtgørelse om biologiske agenser.

Vektor: Vektoren er non-konjugerbar og indeholder antibiotika-resistens mod Ampicillin og Tetracyclin. Disse er dog ikke transposable.

Insert: De overførte gener for *M. tuberculosis* antigener er ikke velkarakteriserede, da kloning er foretaget ved "shotgun"-metoden. Derfor kan der muligvis påføres værten patogene egenskaber.

Sundhedsaspekter ved den endelige GMO: Da vektoren er non-konjugerbar, vil generne ikke kunne overføres til tarmbakterier. Der er imidlertid risiko for, at nogle af coli-klonerne har fået patogene egenskaber.

Klassificering

Projektet kan ikke udføres i klasse 1, da der er usikkerhed om, hvilke risici der knytter sig til de klonede gener. Det vurderes, at de endelige GMO'er ikke vil være så patogene som donororganismen. Derfor vil projektet kunne udføres i mindst klasse 2.

Man kan overveje at nedklassificere til laboratorieklasser 1, når enkelte kloner er velkarakteriserede med hensyn til det overførte gen og dets produkts eventuelt skadelige virkning.

4. titel: Produktion af signalstoffet somatostatin ved hjælp af adenovirale vektorer.

Vært: 293 cellelinje som replikationscellelinje og en hamstercellelinje.

Donor: cDNA bibliotek fra *Homo sapiens*.

Vektor: Adenoviral vektor, deriveret fra Adenovirus type 5. Vektoren er deleteret i E1a og E1b regionerne i forhold til vildtype Adenovirus-genomet.

Insert: Signalstoffet somatostatin. Genet udtrykkes under kontrol af CMV-promotoren.

Vektoren med det indsatte gen indføres i 293 cellelinjen, hvorved rekombinant adenovirus dannes og amplificeres. Rekombinant adenovirus anvendes til at transducere hamsterceller *in vitro*.

Risikovurdering

Vært: Hamstercellelinjen er en cellekultur fra en højerestående eukaryot. 293 cellelinjen er en human cellelinje, der indeholder 14 pct. af adenovirus genomet, herunder E1 regionen.

Donor: Donormaterialet stammer fra et humant cDNA bibliotek. Donormaterialet frembyder derfor ikke i sig selv nogen risiko.

Vektor: Vektoren stammer fra adenovirus, der er en risikogruppe 2-organisme, jf. bekendtgørelse om biologiske agenser. Den forårsager influenza hos mennesker. CMV-promotoren er en middelstærk promotor.

Insert: Det klonede gen er et biologisk højvirksomt stof, der vil kunne udøve en effekt på hypofysen.

Sundhedsaspekter ved den endelige GMO: Det kan ikke udelukkes, at der kan dannes replikationskompetente virus med bred værtsspecificitet, inkl. humane celler ved rekombination i replikationscellelinjen.

Klassificering

Projektet skal udføres i mindst laboratorieklasser 2, fordi der kan dannes replikationskompetente virus med humanspecificitet, og fordi der er tale om et biologisk højvirksomt stof, der kan udøve en lokal effekt på hypofyse-celler, og som udtrykkes under kontrol af en middelstærk promotor.

2.4. Eksempel på laboratorieklasser 3-projekt

5. titel: Ekspresion i eukaryote celler af gen kodende for Fibroblast Growth Factor-lignende faktor (FGF-lignende faktor).

Vært: Hamstercellelinje og Murin amfotrop pakkecellelinje.

Donor: cDNA bibliotek fra Homo sapiens.

Vektor: Retroviral vektor, deriveret fra murint leukæmivirus. Vektoren indeholder mindre end to tredjedele af det retrovirale genom og er replikationsdeficient. Indeholder neomycinresistens-genet.

Insert: FGF-lignende vækstfaktor. Genet udtrykkes under kontrol af LTR's (Long Terminal Repeat) enhancer/promotor.

Vektoren med det indsatte gen indføres i pakkecellelinjen, der medfører dannelse af retrovirus-partikler med bred værtsspecificitet. Det høstede virus bruges til at inficere hamsterceller *in vitro*.

Risikovurdering

Vært: Værterne er cellekulturer fra højerestående eukaryoter. Den murine pakkecellelinje indeholder de nødvendige gener for dannelsen af retrovirus-partikler ud fra vektoren.

Donor: Donormaterialet stammer fra et humant cDNA bibliotek. Donormaterialet udgør således ikke i sig selv nogen risiko.

Vektor: Murine retrovirus virus kan inficere mus, rotter og hamstere, men ikke mennesker, og det kan ikke transformere humane celler *in vitro*. Neomycin-resistensen i eukaryote celler kan selekteres med G418.

Insert: Det klonede gen koder for et biologisk højvirksomt stof, der ved en fysiologisk koncentration på få µg/ml vil kunne udøve en effekt på celler. Det klonede gen udtrykkes under kontrol af LTR's promotor, det vil sige under ikke-fysiologiske betingelser.

Sundhedsaspekter ved den endelige GMO: Det kan ikke udelukkes, at der ved rekombination i pakkecellelinjen kan dannes replikationskompetente virus med bred værtsspecificitet, inkl. humane celler.

Klassificering

Projektet skal udføres i mindst laboratorieklasser 2, fordi der kan dannes replikationskompetente virus med bred værtsspecificitet. Da det desuden er et biologisk højvirksomt stof, der udøver en ekstern effekt på celler ved en meget lav koncentration, og som udtrykkes under kontrol af en middelstærk promotor, skal projektet mindst udføres i laboratorieklasser 3.

3. Integrering af risikovurderingen i virksomhedens arbejdspladsvurdering

Virksomheder, der har pligt til at udarbejde arbejdspladsvurdering (APV) kan vælge at integrere risikovurderingen i virksomhedens APV i stedet for både at foretage risikovurdering efter bekendtgørelsen og udarbejde APV. Det er en forudsætning, at alle elementer fra både risikovurderingen og APV'en tages med i den integrerede vurdering.

Herved kan virksomheden foretage en samlet identifikation af samtlige risici for menneskers sikkerhed og sundhed samt for det ydre miljø. Det må formodes, at risikovurderingen i vidt omfang vil opfylde kravene til APV, og den kan derfor normalt erstatte APV'en på det pågældende område.

De dele af den samlede vurdering af arbejdet, der stammer henholdsvis fra risikovurderingen og fra APV'en, kan ajourføres/revideres uafhængigt af hinanden. Der er ikke krav om, at risikovurderingen skal revideres hvert tredje år, som det kræves for APV.

4. Ordliste

Ordlisten forklarer særlige fagudtryk, som de skal forstås i At-vejledningen. Ikke alle fagudtryk findes i ordlisten, fordi visse basale termer inden for mikrobiologi og genteknologi forudsættes at være kendt.

Allergenicitet: Evne til at fremkalde overfølsomhedsreaktion.

Amfotrop (polytrope) virus: Virus, der kan inficere mange (alle) arter ved at binde sig til flere forskellige receptorer på værtscellerne. Virus kan således krydse artsbarrierer.

Asporogen: Ikke sporedannende.

Biologisk højvirksomme stoffer: Stoffer, der har signalfunktion i den menneskelige organisme, fx hormoner og lymfokiner.

Biologisk system: Samtlige anvendte biologiske materialer, det vil sige alle celler, væv, organismer, virus og plasmider, der anvendes som donor, vært, vektor eller genteknologisk fremstillet organisme.

Differentiering: Ændring af cellefunktion og -morfologi fra stamcelle til specialiseret celle.

Donor: Den organisme, celle eller det cellemateriale, som det anvendte genetiske materiale stammer fra.

Ecotrop virus: Virus, der kun kan inficere en enkelt art (fx mus) ved at binde sig til artsspecifikke receptorer. Virus kan således ikke krydse artsbarrierer – den er værtsspecifik.

Genteknologisk arbejde: Anvendelse af genteknologiske teknikker eller anvendelse, håndtering og opbevaring af genteknologisk fremstillede celler, organismer eller virus samt væv af sådanne organismer.

Habitat: En organismes levested, fx jord eller human tarm.

Indigene (endogene) vektorer: Vektorer, der stammer inde fra cellen.

Insert: Indsat materiale i vektoren, gen eller andet.

Invasivitet: Evne til at trænge gennem vævsbarrierer.

Kolonisationsevne: Evne til at etablere sig og reproducere i en vært uden nødvendigvis at invadere eller ødelægge væv.

Kommunikabilitet: Overførselsmekanisme mellem værter.

Konjugation: Overførsel af DNA fra en bakterie til en anden gennem pili.

Non-permissive forhold: Forhold, der ikke tillader optimal cellevækst og -deling i kulturen.

Onkogener: Gener, der kan transformere celler *in vitro*.

Patogen: Sygdomsfremkaldende.

Patologisk: Sygelig.

Profylakse: Forebyggelse af sygdom.

Protoonkogener: Normale cellegener, der er beslægtet med onkogener.

Secernere: Udskille.

Transformation: Celleforandring.

Transmissionsevne: Den patogene organismes overførselsevne.

Vektor: Det biologiske materiale, der kan benyttes til at indføre genetisk materiale (insert) i en vært.

Virulens: Grad af sygdomsfremkaldende evne (patogenicitet) samt evne til at kolonisere værten.

Vært: Den celle eller organisme, som det genetiske materiale indføres i. Ved anvendelse af cellehybridiseringsteknik, hvor der ikke meningsfyldt kan skelnes mellem donor og vært, skal de anvendte celletyper alle opfattes som værter.

Værtsspektrum: Bredden af organismer, der kan fungere som værter.

Værtsspecificitet: Hvilke – specifikke – organismer, der kan fungere som vært.

Xenotrope virus: Virus, der kan inficere mange arter, undtagen den art, de er dannet i, ved at binde sig til specifikke receptorer. Det betyder, at de kan inficere mange andre arter end den, de er opstået i.

Jens Jensen

Regler:

Bekendtgørelse om genteknologi og arbejdsmiljø

Læs også Arbejdstilsynets vejledning om:

(1) Klassifikation af laboratorier til genteknologisk arbejde.

Læs også branchearbejdsmiljørådenes vejledninger mv.:

Branchearbejdsmiljørådenes vejledninger kan findes på de enkelte branchearbejdsmiljøråds hjemmesider. Der er link til disse hjemmesider på Arbejdstilsynets hjemmeside www.at.dk

Arbejdstilsynet

Postboks 1228
0900 København C
Telefon 70 12 12 88
Telefax 70 12 12 89
e-post at@at.dk
www.at.dk

Prepress: HellasGrafisk A/S – Tryk: Scanprint A/S

