

Prevádzkový poriadok laboratória BSL3 – Z119

pre prácu s geneticky modifikovanými organizmami RT3

(podľa §9 ods.3) Vyhlášky č. 274/2019 Z.z.)

- 1. Opis pracovných priestorov:** laboratórium BSL3 sa nachádza v miestnosti Z119 na 2. poschodí Zverinca Virologického ústavu (ZVÚ) Biomedicínskeho centra SAV, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava. Laboratórium je zatriedené do RT3 a je určené pre prácu s GMO RT3 a RT2.

Laboratórium je určené pre používanie genetických technológií, techník rekombinantnej nukleovej kyseliny, vrátane tvorby nových kombinácií genetického materiálu vkladáním molekúl nukleovej kyseliny vytvorených mimo organizmu do vírusu, bakteriálneho plazmidu alebo iného systému nosiča a ich vnesenie do príjemcu, v ktorom sa prirodzene nevyskytujú, ale v ktorom sú schopné kontinuálne sa množiť. V laboratóriu sú vykonávané aj iné laboratórne postupy vyžadujúce úroveň ochrany BSL3.

Laboratórium Z119 je oddelená miestnosť s individuálnou vzduchotechnikou, ktorá zabezpečuje, že vzduch vŕhaný a odsávaný z miestnosti je filtrovaný cez vysokoúčinné HEPA filtre, Vzduch v miestnosti je v porovnaní s vonkajšou atmosférou v podtlaku. Pred vstupom do miestnosti je hygienická slučka. Pracovné i stavebné povrchy (podlahy, steny a stropy) neprepúšťajú vodu, sú ľahko umývateľné, chemicky odolné. Miestnosť je vybavená niekoľkými pozorovacími oknami. Laboratórium má vlastné vybavenie, vrátane laboratórneho mobiliáru, laminárnych boxov s HEPA filtrami a UV žiaričmi, inkubátorov, chladiacich a mraziacich boxov, centrifúg a pod. Súčasťou laboratória Z119 je aj pokusná miestnosť pre zvieratá, v ktorej je umiestnený chovný box pre zvieratá – stojan s individuálne ventilovanými kliečkami (IVC), ktoré sú napojené na vlastnú klimatizačnú jednotku s HEPA filtrami.

2. Pravidlá práce s GMO:

- počas každej práce v laboratóriu Z119 je nutné nosiť osobné ochranné prostriedky určené na prácu s biologickými faktormi 3. skupiny;
- dvere uzavretého priestoru sú počas práce uzavreté;
- pracovný povrch musí byť dekontaminovaný po každej manipulácii a na konci pracovného týždňa, podlaha je denne umývaná detergentami určenými na dezinfekciu;
- ak sa pracovné miesto kontaminovalo, okamžite musí byť dekontaminované;
- počas manipulácie s GMO sa neodporúča nosiť na rukách hodinky alebo šperky;
- pracovný odev, ktorý bol kontaminovaný s GMO, musí byť pred vyhodením dekontaminovaný a likvidovaný v spaľovni;
- v tomto priestore sa nesmie fajčiť, jesť a požívať nápoje;
- GMO musia byť čitateľne označené.

3. Spôsob uchovávania GMO:

- v uzavretom priestore sa budú GMO uchovávať krátkodobo v chladničke (+4°C), príp. v mrazničke (-20°C);
- GMO musia byť viditeľne označené tak, aby bolo možné ich bližšie identifikovať v registračnom systéme;
- geneticky nemodifikované organizmy sa uchovávajú oddelene od GMO;
- nevyužívané GMO RT3 musia byť zlikvidované sterilizáciou pri 121°C počas 30 min. GMO RT2 musia byť zlikvidované sterilizáciou pri 121°C počas 30 min alebo minimálne inaktíváciou v dezinfekčnom roztoku 5% chlórnan sodný/24 hod, 2% roztok alkalického glutaraldehydu/60 minút. Finálna likvidácia – spaľovňa.

| Podmienky uskladnenia GMO | Spôsob uchovávanía GMO |
|----------------------------------|--|
| chladnička (+4°C) | ependorfove skúmavky v označených krabičkách |
| | označené skúmavky v stojanoch |
| mraznička (-20°C) | ependorfove skúmavky v označených krabičkách |
| | označené skúmavky v stojanoch |

4. Spôsob označovania GMO:

- názov GMO;
- názov genetickej modifikácie, ktorú obsahujú;
- dátum uchovania;
- meno pracovníka, ktorý GMO uchováva.

5. Spôsob likvidácie GMO:

- Tuhý kontaminovaný odpad sa separuje do označených umývateľných nádob s vloženým plastovým vreckom alebo jednorazových nádob s vekom. Tuhý odpad, podobne ako aj tekutý odpad, sa autoklávuje v priamo v uzavretom priestore. Definitívne sa likviduje v zdravotníckej spaľovni.
- Ostrý odpad je zberaný do pevných uzatvárateľných a spáliteľných obalov. Definitívne sa likviduje v zdravotníckej spaľovni.
- Likvidáciu mŕtvych tiel zvierat zabezpečujú zmluvné oprávnené firmy.
- GMO zatriedené do RT1 určené na likvidáciu sú inaktivované chemicky ponorením do dezinfekčného roztoku (napr. 1% ajatín/30 min., 3% chloramín B/30 min., 5% SAVO/1 hod., 5% chlorňan sodný/24 hod), následne sa sústreďujú v nádobách na to určených a definitívne likvidujú v spaľovni.

6. Podmienky prenosu GMO v uzavretých priestoroch a na verejných priestoroch:

a) prenos GMO v priestoroch používateľa:

- GMO RT3 uzavretý priestor neopúšťajú.
- GMO RT2 musia byť prenášané v pevne uzavretých, povrchovo nekontaminovaných a pokiaľ je to možné v nerozbitných nádobách tak, aby nedošlo k ich úniku do okolia.

b) prenos GMO na verejných priestoroch:

- GMO, ktoré patria do RT2, musia byť prenášané v dvoch pevne uzavretých nádobách. Medzi jednotlivými prenášanými nádobami musí byť umiestnený vhodný absorbujúci materiál, ktorý vyplní priestor medzi nimi. V prípade použitia suchého ľadu, vonkajšia nádoba musí byť vybavená ventilom, ktorý umožní ventiláciu uvoľňovaného CO₂.
- identifikačné údaje o prenášanom materiáli musia byť uvedené v sprievodnom liste a na každej prenášanej nádobe.
- každý verejný transport GM materiálu musí byť oznámený vedúcemu projektu a musí byť v súlade s ADR (zákon č. 56/2012 Z. z. o cestnej doprave v znení neskorších predpisov - §34, §35).

7. Zabezpečenie uzavretých priestorov pred únikom GMO pri prevádzke:

a) Uzavretý priestor, laboratórium BSL3 – Z119 a jeho stavebno-technické zabezpečenie predstavuje dostatočnú zábranu znemožňujúcu fyzický kontakt GMO s okolím a bariéru voči nekontrolovateľného úniku GMO. V uzavretom priestore je redukovaný pohyb osôb. Mechanické prekážky tvoria dvere, nepriepustné steny. Biologické prekážky tvoria lepiace pasce na hľadavce a hmyz.

b) Chemické zábrany predstavujú dezinfekčné prostriedky, ktoré sú rutinnou výbavou laboratória. Dôležitý je spôsob likvidácie GMO a zabezpečenie dezinfekcie odpadu, ktorý môže pri práci s GMO vzniknúť.

Systém práce s GMO je zabezpečený tak, aby sa do bežného odpadu, ani kanalizácie nedostali žiadne GMO. Hlavnou zásadou je dôsledná inaktivácia a likvidácia všetkých nepotrebných GMO autoklávovaním 30 minút pri 121°C ešte pred zlikvidovaním odpadu v zdravotníckej spaľovni, a dezinfekcia a dekontaminácia všetkých povrchov, nástrojov a nádob, ktoré boli v kontakte s GMO chemickými inaktivačnými a dezinfekčnými prostriedkami, ktoré sú povinnou výbavou uzavretého priestoru.

Kontrolné a iné ochranné opatrenia pre laboratórium

(podľa Prílohy č. 1 k Vyhláske č. 274/2019 Z. z.)

| | Popis | Úroveň ochrany - 3 | Laboratórium BSL3 – Z119 |
|---|---|--|--|
| 1 | Laboratórne miestnosti – izolácia ¹⁾ | vyžaduje sa | samostatný súbor miestností |
| 2 | Laboratórium hermeticky uzatvorené na dezinfekciu plynom | vyžaduje sa | áno |
| Vybavenie (zariadenie laboratória) | | | |
| 3 | Ľahko umývateľné povrchy odolné vode, kyselinám, zásadám, rozpúšťadlám, dezinfekčným látkam a dekontaminačným činidlám | vyžaduje sa (pracovné stoly, podlaha) | ľahko umývateľné povrchy a podlaha odolné vode, kyselinám, zásadám, rozpúšťadlám, dezinfekčným látkam a dekontaminačným činidlám |
| 4 | Vchod do laboratória cez dekontaminačnú miestnosť ²⁾ | voliteľné | áno |
| 5 | Nižší tlak úmerný tlaku okolitého prostredia | vyžaduje sa okrem ³⁾ | áno |
| 6 | Odsávaný a vháňaný vzduch do laboratória by mal byť HEPA-filtrovaný | vyžaduje sa (HEPA) ⁴⁾ odsávaný vzduch okrem ³⁾ | áno |
| 7 | Aseptický box | vyžaduje sa | áno |
| 8 | Autokláv | v mieste ⁵⁾ | áno |
| Systém práce | | | |
| 9 | Zákaz vstupu | vyžaduje sa | áno, označenie zákazu vstupu nepovolaným osobám |
| 10 | Označenie bionebezpečia na dverách | vyžaduje sa | áno, označenie bionebezpečia na dverách |
| 11 | Zvláštne opatrenie na kontrolu aerosólu v ovzduší | vyžaduje sa zamedziť | Tvorbe aerosólu sa zamedzuje používaním GMO iba v laminárnych boxoch, zvieratá sú umiestnené v individuálne ventilovaných kliečkach. |
| 12 | Sprcha | voliteľné | nie |
| 13 | Ochranný odev | vhodný ochranný odev a (voliteľné) obuv | pracovný plášť, prezuvky |
| 14 | Rukavice | vyžaduje sa | ochranné rukavice |
| 15 | Účinná kontrola vektorov (napr. hlodavcov a hmyzu) | vyžaduje sa | áno, lepiace pasce na hlodavce a hmyz |
| Odpad | | | |
| 16 | Inaktivácia geneticky modifikovaných mikroorganizmov a geneticky modifikovaných organizmov v odpadových vodách z umývadiel na umývanie rúk, sprch a v podobných odpadových vodách | voliteľné | nie |
| 17 | Inaktivácia geneticky modifikovaných mikroorganizmov a geneticky modifikovaných organizmov v kontaminovanom materiáli a v odpade | vyžaduje sa | Inaktivácia autoklávovaním 30 minút pri 121 °C. Po inaktivácii je odpad likvidovaný v spaľovni. |
| Iné opatrenia | | | |
| 18 | Laboratórium musí mať svoje vlastné vybavenie | voliteľné | nie |
| 19 | Laboratórium musí mať pozorovacie okienko alebo alternatívne zariadenie tak, že môžu byť prítomní v laboratóriu videní | voliteľné | áno |

1) Izolácia – laboratórium je oddelené od iných miest v budove alebo je v oddelenej budove.

2) Dekontaminačná miestnosť (vstupná hygienická slučka) – vchod musí byť cez dekontaminačnú miestnosť, t. j. komoru izolovanú od laboratória. Čistá strana dekontaminačnej miestnosti musí byť oddelená od zakázanej strany prezliekárňou alebo sprchami, a ak je to možné, blokovacími dverami.

3) Činnosti, pri ktorých sa prenos vzduchom nevyskytuje.

4) HEPA (High efficiency particulate air) = filter s vysokou účinnosťou odstraňujúci častice zo vzduchu. Ak sa používajú vírusy, ktoré nie sú zadržané HEPA-filtrami, sú na odsávanie vzduchu nevyhnutné dodatočné požiadavky.

5) Len schválené postupy, ktoré dovoľujú bezpečný prenos materiálu do autoklávu mimo laboratória a ktoré zabezpečujú rovnocennú úroveň ochrany.

Úroveň ochrany pre činnosti v bunkách pre zvieratá (podľa Prílohy č. 3 k Vyhláške č. 274/2019 Z. z.)

| Popis | | Úroveň ochrany 3 | |
|-------|--|-------------------------------|---|
| | | | Laboratórium BSL3 – Z119 |
| 1 | Izolácia buniek pre zvieratá ¹⁾ | vyžaduje sa | Laboratórium BSL3-Z119 vo ZVÚ BMC SAV je izolovaná skupina miestností - prezliekareň, virologické laboratórium s autoklávom, experimentálna miestnosť s IVC kliečkami pre zvieratá. Od ostatných priestorov je BSL3 jednotka oddelená uzamykateľnými dverami opatrenými elektronickým zámkom. Vstup oprávneným zamestnancom je monitorovaný pomocou kódovaného prístupu. Kód majú pridelený len zamestnanci BMC oprávnení na vstup do BSL3. |
| 2 | Zariadenia pre zvieratá oddelené uzamykateľnými dverami ²⁾ | vyžaduje sa | áno |
| 3 | Zariadenia pre zvieratá navrhnuté tak, aby uľahčili dekontamináciu [vodovzdorný a ľahko umývateľný materiál (kliečky, atď.)] | vyžaduje sa | Stojany na kliečky, kliečky, stoly sú z umývateľného materiálu. Kliečky sú autoklávovateľné. |
| 4 | Podlaha a/alebo stropy ľahko umývateľné | vyžaduje sa (podlaha a steny) | Podlahy, steny aj stropy v miestnostiach sú umývateľné. |
| 5 | Zvieratá sú držané vo vhodných zariadeniach, ako sú napr. kliečky, miestnosti alebo nádoby | voliteľné | Áno, v individuálne ventilovaných kliečkach. |
| 6 | Filtre na izolátoroch alebo izolovaných miestnostiach ³⁾ | vyžaduje sa | áno, kliečky sú vybavené HEPA filtrami, celá BSL3 jednotka má vzduchotechniku, v ktorej je vzduch filtrovaný cez HEPA filtre. |

1) Bunka pre zvieratá: budova alebo osídlené miesto v budove, kde sú zariadenia, a iné miesta, ako sú napríklad prezliekarene, sprchy, autoklávy, priestory na uskladnenie potravín atď.

2) Zariadenie pre zvieratá: zariadenia, ktoré sa normálne používajú na umiestnenie chovných, šľachtených alebo pokusných zvierat, alebo zariadenia používané na menšie chirurgické zákroky.

3) Izolatory: priehľadné kabíny, kde možno umiestniť zvieratá mimo kliečky; pre veľké zvieratá musí zodpovedať veľkosť miestnosti.

8. Metódy na odstránenie GMO pri ich nekontrolovanom úniku:

Každá udalosť, pri ktorej sa mohli GMO uvoľniť do prostredia mimo pracovného priestoru musí byť ohlásená vedúcemu projektu a zaznamenaná.

Udalosť

- pád nádoby, ktorá obsahuje GMO, pričom došlo k rozliatiu suspenzie na podlahu/stôl v pracovnom priestore
- GMO sú uložené v poškodenej nádobe alebo sú infikované patogénom
- prítomnosť GMO v odpade ako dôsledok nesprávneho postupu pri inaktivácii

Postup v prípade udalosti:

- prerušiť prácu, kontaktovať vedúceho projektu a zreteľne opísať danú udalosť
- pokúsiť sa zabrániť ďalšiemu šíreniu GMO okamžitou aplikáciou 70% etanolu, 1 – 5% roztoku chloramínu B alebo 2% roztoku alkalického gluteraldehydu. Materiál, ktorý bol v priamom styku s biologickým materiálom (rukavice, utierky, pracovný odev a pod.) sa zlikviduje v spaľovni. Sklenený materiál sa dekontaminuje 1 – 5% roztokom chloramínu B a autoklávovaním 30 minút pri 121 °C.
- GMO uložené v poškodenej nádobe opatrne premiestniť (preliať, prepipetovať, preložiť) do nepoškodenej nádoby, nádobu označiť a odložiť. Poškodenú nádobu dekontaminovať chemicky 1 – 5% roztokom chloramínu B a autoklávovaním 30 minút pri 121 °C.

Nehoda

Nehoda zahŕňa všetky udalosti, pri ktorých počas manipulácie s GMO došlo k zraneniu alebo pravdepodobnej kontaminácii zamestnancov. Všetky nehody musia byť zaznamenané.

Postup pri nehode:

Okamžite oznámiť nehodu vedúcemu projektu, vedúcemu oddelenia alebo predsedovi výboru pre biologickú bezpečnosť:

Vedúci projektu: RNDr. Ingrid Ovečková, tel.: 59302421, č. dverí: 260

Vedúci oddelenia: RNDr. Boris Klempa, DrSc., tel.: 59302465, č. dverí: 257

Predseda výboru pre bezpečnosť: RNDr. Ingeborg Režuchová, PhD., tel.: 59302439, budova VÚ BMC SAV, 4p. č. dverí 414

- v prípade poranenia (porezanie, pichnutie) nechať ranu krváčať tak dlho ako je to možné, potom opláchnuť pod tečúcou vodou a následne opláchnuť 70% alkoholom alebo jódom tinktúrou
- v prípade, že boli zasiahnuté oči, ústa a iné, opláchnuť ich dostatočným množstvom vody
- vyhľadať lekársku pomoc
- nehodu písomne zaznamenať

Porušenie pracovných pravidiel

Každé porušenie pracovných pravidiel musí byť zaznamenané.

Príklady porušenia pravidiel:

- geneticky modifikované organizmy sú uskladnené bez označenia
- použitie GMO, ktoré nebolo zaevidované v prevádzkovom denníku
- neposkytnutie údajov a neinformovanie vedúceho projektu o zámere používať GMO RT2 pre účely Ohlásenia začatia činnosti zatriedenej do rizikovej triedy 2 v uzavretom priestore
- neposkytnutie údajov a neinformovanie vedúceho projektu o zámere používať GMO RT3 pre účely podania Žiadosti o vydanie súhlasu na používanie v uzavretých priestoroch pre činnosti zatriedené do rizikovej triedy 3.

Postup pri porušení pracovných pravidiel:

Porušenie pracovných pravidiel zaznamenáva vedúci projektu a následne ohlásí vedúcemu oddelenia alebo predsedovi výboru pre biologickú bezpečnosť. Voči pracovníkovi, ktorý porušil pracovné pravidlá, sa vyvodzuje zodpovednosť a postupuje sa podľa platného Pracovného poriadku BMC SAV.

9. Prevádzkový denník

Všetky činnosti spojené s GMO sa zaznamenávajú do Prevádzkového denníka.

10. 09. 2020

RNDr. Ingrid Ovečková
vedúci projektu, ev. č. 49/02/11

Prevádzkový poriadok schválil Výbor pre bezpečnosť BMC SAV dňa: 24. 09. 2020.

RNDr. Ingeborg Režuchová, PhD.
Predseda výboru pre bezpečnosť BMC SAV