

DE OEC BMBI Szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-014	
	Érvényessége: 2013. szeptember 1-től	
A Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet által üzemeltetett BSL2 laboratórium biológiai biztonsági terve		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum
Jóváhagyta:	aláírás	dátum
Tartalma: 4 oldal	-- darab melléklettel együtt	

Felülvizsgálta (dátum/aláírás):	Ellenőrizte:	Jóváhagyta:

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-014	
A Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet által üzemeltetett BSL2 laboratórium biológiai biztonsági terve		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum

A BSL2 (biosafety level 2) laboratórium lehetővé teszi mérsékelt biológiai veszélyt hordozó sejtekkel, mikroorganizmusokkal történő munkavégzést. A Debreceni Egyetem Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet által 2013-ban létrehozott BSL2 laboratóriumában kismértékű biológiai veszélyt hordozó sejteket és vírus vektorokat kívánunk használni. A biológiai biztonsági terv áttekintése előtt fontosnak tartjuk összefoglalni, hogy milyen biológiai mintákat lehet használni ebben a laboratóriumban és ezek milyen veszélyforrást hordoznak.

BSL2 laboratóriumban felhasznált biológiai minták

A BSL2 laboratóriumban leggyakrabban primer humán sejtek izolálása és tenyésztése folyik. Ezek a sejtek különféle emberi szövetekből nyerhetők ki. Intézetünk kutatói heti rendszerességgel tisztítanak a Véradó Állomásról származó vérkészítményeket. A Véradó Állomásról úgynevezett 'buffy coat' készítmények szerezhetők be, melyek dúsítva tartalmazzák a perifériás vér fehérvérsejtjeit. Ezekből viszonylag egyszerű eljárással lehet izolálni a mononukleáris sejteket, melyekből további lépésekkel elkülöníthetők a monociták (lásd részletesen a BSL2-003 fejezetben). Ezen túlmenően Intézetünkben több kutató foglalkozik humán sejtek kinyerésével, újszülöttekből származó köldökszövetből (lásd részletesen a BSL2-004 fejezetben). A Véradó Állomásról kapott vérminták egészséges emberekből származnak. A másik esetben szintén egészséges személyektől származó humán szövetminták felhasználása történik, kivételt jelent cöliakiás betegségre hajlamos egyének köldökszövet mintáinak a feldolgozása. Fontos kiemelni, hogy a BSL2 laboratóriumban előzetesen ismert fertőző betegekből származó sejt vagy szövetminták nem kerülhetnek feldolgozásra.

A humán minták mellett úgynevezett vírusvektorokat is használunk a BSL2 laboratóriumban. Sokféle vírus használható génvektorként; jelenleg Intézetünkben lentivírus és a retrovírus alapú vektor rendszerek használhatók. A lentivírusokra jellemző, hogy az emlős sejteket megfertőzve genomjuk beintegrálódik a gazdasejtbe, így lehetővé válik sejtekbe gének bevitele. A lentivírusok jellegzetessége, hogy nem osztódó sejteket is képesek megfertőzni. Vektorként a viszonylag biztonságos úgynevezett harmadik generációs lentivírusokat használjuk (lásd részletesen a BSL2-001 fejezetben). Ezek eredetileg a HIV vírusból lettek létrehozva, de bennük az infektivitást és patogenitást okozó gének eliminálva vagy szeparálva lettek. Ezen vektoroknál a vírus eredetű burok fehérje VSV-G-vel van helyettesítve, ami lehetővé teszi, hogy az ilyen vírusok többféle sejtet is megfertőzzenek, de a sejtekbe bejutva azokban nem tud további fertőzőképes virion létrejönni, azaz a fertőzés nem tud tovább terjedni. A retrovírusok közül a Promega phoenix retrovirális rendszert használjuk (lásd részletesen a BSL2-002 fejezetben).

Összefoglalva, az általunk üzemeltetett BSL2 laboratóriumban primer humán minták, illetve vírus alapú génvektorokat használunk. A humán szövetminták, illetve a belőlük létrehozott sejtek elvileg kórokozó mentesek, ugyanakkor teljesen nem zárható ki bizonyos patogének jelenléte. Ezért potenciális fertőzőforrásként kell kezelni az ilyen humán biológiai mintákat. Az általunk használt lentivírusok és retrovírusok biztonságosak tekinthetők, de itt is fontos megakadályozni, hogy ilyen vírusok bejussanak az emberi szervezetbe.

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-014	
A Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet által üzemeltetett BSL2 laboratórium biológiai biztonsági terve		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum

Biológiai biztonsági terv a BSL2 laboratóriumban

Az előzőekben ismertetésre kerültek azok a sejtek, illetve virális rendszerek, melyeket napi szinten használunk a BSL2 laboratóriumban. Ezek a sejtek/vírusok mérsékelt biológiai kockázatot hordoznak, ennek ellenére fontos a szabályok betartása és a lehetséges veszélyforrások kiszűrése.

A fertőzések megakadályozására az alábbi intézkedéseket tartjuk szükségesnek:

A BSL2 laboratóriumhoz csak oktatáson részt vett kutatók/hallgatók, illetve szakasszisztensek kaphatnak belépési engedélyt. Nekik ismerni és alkalmazni kell a BSL2 laboratórium előírásait, továbbá a BSL2 laboratórium dolgozóinak tudni kell a potenciális veszélyforrásokról.

A BSL2 laboratóriumban csak az előírt védőfelszerelésben szabad dolgozni: kötelező a fehér laborköpeny viselése, melyet más laboratóriumokban, irodában nem szabad hordani. A munka befejezését követően a BSL2 laboratórium előtti kialakított fogason kell a köpenyeket tárolni. A laborköpenyen túlmenően védő gumikesztyű használata is kötelező. A kísérleti munka befejeztével a védőkesztyűt le kell venni, kezét kell mosni, s csak ezt követően lehet elhagyni a laboratóriumot. A laboratóriumban szájvédő maszk és védőszemüveg is rendelkezésre áll, ezeket akkor ajánlott használni, ha valaki olyan mintákkal dolgozik, ami könnyen szétfröccsen vagy aeroszolt képezhet.

Ha valakinek a kezére/karjára védőruházat ellenére rákerült valamilyen biológiai szennyeződés, akkor azt azonnal le kell mosni Sensiva kézfertőtlenítő szer segítségével. A BSL2 laboratóriumban rendszeresített Sensiva kézfertőtlenítő lenti- és hepatitis vírusokat is képes elpusztítani.

A BSL2 laboratóriumban külön figyelni kell a szűrős tárgyak használatával. Általános szabály, hogy a laboratóriumban kerülni kell az éles eszközök/szűrős tárgyak alkalmazását. Ha mégis használunk szűrős tárgyakat (pl. fecskendő, szike), akkor ezek körültekintő alkalmazása nagyon fontos, ilyen esetben célszerű dupla kesztyűt viselni. A használt fecskendőket és tűket átszűrődésnek ellenálló dobozba kell összegyűjteni. Tilos széthajigálva hagyni őket. Erre a célra vastag falú, műanyag dobozokat alkalmazunk, melyek mindig megtalálhatók a steril fülkékben. Ha véletlenül valami üvegeszköz eltörik, azonnal le kell állítani a munkát és üvegszilánk mentesíteni kell a fülkét vagy a munka-asztal felületet.

A fertőzésveszély elkerülésének leghatékonyabb módja, ha a biológiai mintákat csak a steril fülkékben nyitjuk ki. Mielőtt a biológiai mintákat behelyeznénk a steril fülkébe, meg kell győződni, hogy a levegőáramlás megfelelő sebességre állt-e be (bekapcsolás után minimum 10 percig kell jártni a steril fülkét). A munka végeztével elsőként fertőtlenítő szerrel (SprayIn-TEVA/Mikrozyd AF Liquide), majd 70%-os etanos oldattal ismételtelen le kell fertőtleníteni a fülke felületét. Továbbá, a nap végén a steril fülke lezárását követően fel kell kapcsolni az UV lámpát, ami további sterilitást biztosít a fülke belsejében. Ha munka közben észleljük, hogy rácszeppen a biológiai anyagot tartalmazó folyadék a fülke felületére vagy oldalára akkor azonnal fertőtlenítő szerrel (SprayIn-TEVA/Mikrozyd AF Liquide) le kell kezelni a szennyezett felületet, majd eltávolítani a szennyezést és többször gondosan megtisztítani a kontaminált részt.

DE OEC BMBI szabványműveleti előírás	Száma: BSL2-014	
A Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet által üzemeltetett BSL2 laboratórium biológiai biztonsági terve		
Készítette:	aláírás	dátum
Ellenőrizte:	aláírás	dátum

A selejtezésre váró biológiai mintákat, illetve az ezekkel szennyezett eszközöket (flaskák, pipettahegyek stb.) zárt badellákba kell gyűjteni és tárolni. A badellákon fel van tüntetve, hogy 'biohazard', ezekhez a takarító személyzet nem nyúlhat, ha megteltek légmentesen le kell zárni őket, s a laboratórium felelősei fogják átszállítani őket az épület alagsorában található zárt tárolóba (ezek égetéssel megsemmisítésre kerülnek). A sejtek tenyésztésekor keletkező nagy térfogatú felülúszó folyadék begyűjtésére egy alternatív lehetőség áll rendelkezésre: a sejttenyészetek felülúszóit vákuummal működő folyadék csapdában gyűjtjük össze. Az itt összegyűjtött tápfolyadék potenciálisan fertőző lehet, ezért ebbe a folyadéktárolóba előzetesen fertőtlenítő oldatot kell rakni (10x töménységű SUMA D4 oldat), s a kiürítése során, kiöntés előtt, ismételten fertőtlenítő folyadékkal (10x töménységű SUMA D4 oldat) kell kezelni. Magasabb kockázatú folyadékokat (humán vér, tömény vírus felülúszó) nem szabad ilyen módon kezelni, begyűjteni. Ezeket az oldatokat tároló edénybe kell gyűjteni mely SUMA D4 kezelés után végül a zárt badellába kerül.

Kerülni kell az olyan munkafolyamatokat, amivel aeroszol keletkezik, ezért a sejteket tartalmazó edényeket/flaskákat minél rövidebb ideig célszerű nyitva tartani. Külön vigyázni kell arra, hogy a tápfolyadékkal szennyezett pipettahegyek ne érjenek a felülethez, az elhasznált pipettahegyeket azonnal az erre rendszeresített pipetta tartó badellákba kell kidobni. Ha a sejttenyésztő fülkén belül vagy a sejttenyésztő fülkén kívül, a sejteket/vírusokat tartalmazó edény megreped, s a folyadék kiszivárog, akkor a kontaminált felületet nagyon alaposan fertőtleníteni (SprayIn-TEVA/Mikrozyd AF Liquide) és tisztítani kell. Különösen az inkubátorokban fontos elkerülni a szivárgásokat, ezért mielőtt bepakoljuk a sejttenyésztő flaskákat fontos meggyőződni, hogy azok nem sérültek-e. Sérült, repedt sejttenyésztő edényt vagy flaskát tilos az inkubátorba helyezni. Ha a sejtek tenyésztése során a flaskák külső felületére rácspepent valami szennyeződés, azt gondosan le kell tisztítani/fertőtleníteni (SprayIn-TEVA/Mikrozyd AF Liquide) mielőtt visszarakjuk a sejttenyésztő inkubátorokba.

Mindezek a felsorolt intézkedések csökkentik a valószínűségét, hogy a BSL2 laboratórium dolgozóinak a szervezetébe kerüljenek potenciálisan betegség ágensek. Ennek ellenére a BSL2 laboratóriumban dolgozóknak évente részt kell venni kötelező munkaegészségügyi szűrő vizsgálaton. Az ilyen vizsgálatok során a dolgozókról teljes vérkép készítése történik, így monitorozhatóak az esetleges betegségek (pl. a máj funkciók megváltozása hepatitis fertőzésre utalhat). Ha a BSL2 laboratóriumban valami baleset történik, akkor ezt azonnal jelenteni kell a BSL2 laboratórium vezetőinek és soron kívül vizsgálat elvégzése kötelező. Ennek részeként az érintett dolgozónak fel kell keresni az üzemorvost, aki intézkedik a további teendőkről (vérvétel, beutalás klinikai vizsgálatra). Mivel az általunk működtetett BSL2 laboratóriumban gyakran használnak humán vérmintákat, ezért erősen ajánlott hepatitis B elleni védőoltás megszerzése.