

HAVARIJNÝ PLÁN
pre činnosti s GMO zatriedených do rizikovej triedy 2

bod 1

a) identifikačné údaje o používateľovi:

Biomedicínske centrum SAV
IČO: 50073869
Dúbravská cesta 9
845 05 Bratislava

štatutárny orgán: prof. RNDr. Silvia Pastoreková, DrSc.
riaditeľka BMC SAV
e-mail: riaditel.bmc@savba.sk

b) identifikačné údaje o výskumnom, vývojovom alebo výrobnom zariadení používateľa (ďalej len „zariadenie“), v ktorom sa nachádzajú uzavreté priestory:

Ústav experimentálnej onkológie
Biomedicínske centrum SAV
Pavilón lekárskeho vied (PLV), Blok A
Dúbravská cesta 9
845 05 Bratislava

c) identifikačné údaje o orgánoch a osobách určených na odstraňovanie následkov havárie, na zabezpečenie zdravotnej starostlivosti pre osoby postihnuté haváriou, na dezinfekciu a podobne:

Hlásenie v rámci organizácie

Zamestnanec, ktorý zistí únik GMO alebo má podozrenie, že došlo k ich úniku, ohlásí túto skutočnosť osobne alebo telefonicky svojmu nadriadenému alebo jeho zástupcovi a následne podľa závažnosti ďalším vedúcim zamestnancom uvedeným v tabuľke. Menovaní sa urýchlene dostavia na miesto havárie.

Funkcia (pracovisko)	Meno	Telefón	Pozn.
Riaditeľ ústavu	prof. RNDr. Silvia Pastoreková, DrSc.	02/59302 404	podľa závažnosti
Bezpečnostný technik	Ing. Csaba Kosa, PhD.	02/32295 016	
Zodpovedný za prácu s GMO (vedúci projektu)	RNDr. Ingeborg Režuchová, PhD.; RNDr. Zuzana Kozovská, PhD.	02/59302 460 02/32295 138	
Zodpovedný za BOZP s biologickými faktormi	RNDr. Ján Košovský, CSc.	02/59302 435	
Riadiaci práce s nebezpečnými chemickými faktormi	Ing. Csaba Kosa, PhD.	02/32295 016	

Hlásenie mimo organizácie

Vedúci zamestnanec riadiaci práce s nebezpečnými chemickými faktormi a vedúci zamestnanec pre príslušné pracovisko ohlásia podľa závažnosti haváriu záchranným službám, orgánom životného prostredia a civilnej ochrany.

Záchranné služby, orgány verejn. zdravotníctva	Telefón	Pozn.
Záchranná zdravotná služba	155, 16 155, 112	
MUDr. D. Gajdošová , lekár v areáli SAV, Dúbr. cesta 9, Ba	02 / 5477 2559	
Regionálny úrad verejného zdravotníctva Bratislava / www.ruvzba.sk	02 / 4333 8286, 0917 426 111	
Úrad verejného zdravotníctva SR / www.uvzsr.sk	02 / 4928 4111	
Národné Toxikologické Informačné Centrum / www.ntic.sk	02 / 5477 4166, 5465 2307 // 0911 166 066	
Správa účelových zariadení SAV, Dúbravská cesta 9, Bratislava	02 / 5477 2148 02 / 5920 0802	
Hasičský a záchranný zbor	150, 112	
Polícia	158, 112	
Odbor CO a krízového riadenia Obvodného úradu Ba	02 / 5931 2111	
Obvodný úrad životného prostredia Ba - ústredňa	02 / 6030 1706	

d) plán zariadenia s vyznačením miest významných pre obmedzenie následkov havárie:

laboratórium č. 4.16/4.15 v budove PLV, 3. posch. Blok A, ÚEO BMC SAV, **reg. č.: 547 0916**

laboratórium č. 4.29 v budove PLV, 3. posch. Blok A, ÚEO BMC SAV, **reg. č.: 548 0916**

laboratórium č. 4.30 v budove PLV, 3. posch. Blok A, ÚEO BMC SAV, **reg. č.: 549 0916**

laboratórium č. 4.36 v budove PLV, 3. posch. Blok A, ÚEO BMC SAV, **reg. č.: 550 0916**

laboratórium č. 5.14 v budove PLV, 4. posch. Blok A, ÚEO BMC SAV, **reg. č.: 551 0916**

(evidenčné číslo je pridelené MŽP SR na základe žiadosti na prvé použitie uzavretých priestorov)



e) údaje o množstve a druhu geneticky modifikovaných organizmov, ktoré by mohli uniknúť pri havárii alebo sa neočakávane rozšíriť do prostredia:

- bunková línia HEK293T (ATCC® CRL-1573™) je komerčná, hypotriploidná bunková línia so 64 chromozómami. Má integrovaný segment DNA adenovírusu typu 5 (1 – 4344 nt) v chromozóme 19.
- pLCS-ITPR3-1 a pLCS-ITPR3-2 sú komerčne dostupné vektory (GenScript, USA) pripravené na báze vektora lentiCRISPRv2 (Sanjana a kol., Nat Methods. 2014 August; 11(8): 783–784. doi:10.1038/nmeth.3047), ktoré obsahujú krátku sgRNA sekvenciu targetujúcu gén kódujúci ITPR3 proteín a gén pre Cas9 endonukleázu.
- pCMV-VSV-G (gag, pol) je komerčný plazmid patriaci do 2. generácie lentivírusových vbal'ovacích vektorov, ktorý je nevyhnutný na tvorbu lentivírusov transfekovanými bunkami. Obsahuje gény: gag a pol.
- psPAX (env) je komerčný plazmid patriaci do 2. generácie lentivírusových vbal'ovacích vektorov, ktorý je nevyhnutný na tvorbu lentivírusov transfekovanými bunkami. Obsahuje gén env. Bez kooperácie s vektorom obsahujúcim gény gag a pol však nie je schopný tvorby vírusových častíc.

Vďaka viacerým modifikáciám (delécia génov spojených s virulenciou HIV, minimálny genóm vírusových častíc, sebainaktivujúce a nereplikačné vlastnosti) nie sú tieto vektory schopné po transfekovaní cieľovej bunky produkovať virulentné vírusové častice a sú tak považované za bezpečné.

Vektory spolu v organizme príjemcu - bunková línia HEK293T vytvoria dočasne existujúce GMO A a zabezpečia produkciu rekombinantného vírusu GMM B. GMO A existuje len dočasne a slúži na produkciu GMM B.

Vektory sú bez použitia genetických technológií nešíriteľné. Žiaden z génov, ktoré tvoria zložky vektorov nenadobudne po transformácii do koncového hostiteľa virulentný, infekčný, inak patogénny, alebo toxikogénny charakter.

Používané množstvo: jednorazovo max. 5×10^7 GMO buniek na experiment.

V laboratóriách registr. č.: **547 0916** (lab. č. 4.15/4.16), **548 0916** (lab. č. 4.29), **549 0916** (lab. č. 4.30), **550 0916** (lab. č. 4.36) a **551 0916** (lab. č. 5.14) bude uskutočnená transfekcia bunkovej línie HEK293T s DNA troch vektorov pLCS-ITPR3-1 alebo pLCS-ITPR3-2, pVSV a pPAX. Po transfekcii budú bunkové línie produkovať rekombinantné lentivírusy. Prítomnosť týchto génov v genóme lentivírusov nespôsobí zmenu fyziologických vlastností, infekčnosti, patogénnosti alebo toxikogénnosti lentivírusu.

Prežitie pripravených lentivírusov pri úniku do prostredia nie je vzhľadom na ich neschopnosť infekcie buniek bez použitia génovej techniky a náročné podmienky kultivácie možné. Okrem toho vzniknuté lentivírusy sú replikačne defektné a slúžia len ako vektory pre následnú stabilnú transdukciiu iných bunkových línií.

Za daných podmienok nepredstavuje žiadna z uvedených skutočností riziko pre človeka a len zanedbateľné riziko pre životné prostredie.

f) opis ochranných opatrení na zabránenie vzniku havárie:

a) Uzavreté priestory, laboratórií vyhradené pre prácu s GMO, predstavujú dostatočnú bariéru pri práci s GMO, ktoré nemajú nepriaznivé účinky na zdravie človeka a životné prostredie. Vo vyhradených priestoroch je redukovaný pohyb osôb a vyhradené priestory sú označené. Uzavreté priestory sú zaradené do rizikovej triedy 2, príslušný prevádzkový poriadok v zariadení zodpovedá bezpečnostným parametrom rizikovej triedy 2.

b) V uzavretých priestoroch sa využívajú genetické technológie, pri ktorých by nemalo dôjsť k neželanému úniku, dôležitý v tomto smere je spôsob likvidácie GMO a zabezpečenie dezinfekcie odpadu, ktorý pri práci s GMO vznikne. Prevádzkový poriadok tento krok rieši tak, aby sa do bežného odpadu ani kanalizácie nedostali žiadne GMO. Hlavnou zásadou je dôsledná dezinfekcia odpadu autoklávaním, prípadne chemickými dezinfekčnými prostriedkami, ktoré sú povinnou výbavou každého laboratória.

	Popis	Úroveň ochrany - 2	Ohlasovateľ/Žiadateľ Biomedicínske centrum SAV
1	Laboratórne miestnosti - izolácia	nevyžaduje sa	Izolácia laboratórií od ostatných častí budovy, kontrolovaný vstup
2	Laboratórium hermeticky uzatvorené na dezinfekciu plynom	nevyžaduje sa	Nie

Vybavenie (zariadenie laboratória)			
3	Ľahko umývateľné povrchy odolné vode, kyselinám, zásadám, rozpúšťadlám, dezinfekčným látkam a dekontaminačným činidlám	vyžaduje sa (pracovné stoly)	Ľahko umývateľné povrchy odolné vode, kyselinám, zásadám, rozpúšťadlám, dezinfekčným látkam a dekontaminačným činidlám
4	Vchod do laboratória cez dekontaminačnú miestnosť ²⁾	nevyžaduje sa	nie
5	Nižší tlak úmerný tlaku okolitého prostredia	nevyžaduje sa	nie
6	Odsávaný a vháňaný vzduch do laboratória by mal byť HEPA-filtrovaný	nevyžaduje sa	nie
7	Digestor	voliteľné	laminárny box
8	Autokláv	v budove	v priestoroch oddelenia
Systém práce			
9	Zákaz vstupu	vyžaduje sa	Označenie zákazu vstupu nepovolaným osobám
10	Označenie bio nebezpečia na dverách	vyžaduje sa	Označenie bio nebezpečia na dverách
11	Zvláštne opatrenie na kontrolu aerosólu v ovzduší	vyžaduje sa minimalizovať	Minimalizuje sa tvorba aerosólu
13	Sprcha	nevyžaduje sa	nie
14	Ochranný odev	vhodný ochranný odev	Pracovný plášť, prezuvky, rukavice
15	Rukavice	voliteľné	ochranné rukavice
16	Účinná kontrola vektorov (napr. hlodavcov a hmyzu)	vyžaduje sa	Pevne uzatvorené okná a lepiace pasce na hlodavce.
Odpad			
17	Inaktivácia geneticky modifikovaných mikroorganizmov	nevyžaduje sa	nie

	v odpadových vodách, z umývadiel na umývanie rúk, sprch a v podobných odpadových vodách		
18	Inaktivácia geneticky modifikovaných mikroorganizmov v kontaminovanom materiáli a v odpade	vyžaduje sa	Chemická dekontaminácia nepotrebných GM buniek v chloramíne. Po inaktivácii je odpad autoklávovaný a definitívne likvidovaný v zdravotníckej spaľovni.
Iné opatrenia			
19	Laboratórium musí mať svoje vlastné vybavenie	nevyžaduje sa	nie
20	Laboratórium musí mať pozorovacie okienko alebo alternatívne zariadenie tak, aby mohli byť prítomní v laboratóriu videní	voliteľné	nie

g) opis havárie, ktorá môže vzniknúť v priestoroch, kde sa používajú genetické technológie:

- Kontaminácia pracovného priestoru – laminárneho boxu geneticky modifikovanými bunkami a plazmidovou DNA pri rozbití alebo vyliatí skúmavky.
- Kontaminácia pracovného priestoru – laminárneho boxu geneticky modifikovanými mikroorganizmami – rekombinantnými vírusmi.

Postup v prípade udalosti:

- ďalšie šírenie geneticky modifikovaných organizmov sa okamžite eliminuje aplikáciou 70% etanolu, 1 – 5% roztoku chloramínu B alebo 2% roztoku alkalického gluteraldehydu. Laminárny box sa uvedie do režimu dezinfekcie - zapne sa UV svetlo.
- materiál, ktorý bol v priamom styku s biologickým materiálom (rukavice, utierky, pracovný odev a pod.) sa dekontaminuje 1 – 5% roztokom chloramínu B a zlikviduje v spaľovni. Sklenený materiál sa dekontaminuje 1 – 5% roztokom chloramínu B a následne autoklávuje.
- prerušiť prácu, kontaktovať vedúceho projektu a zreteľne opísať danú udalosť.
- zaznamenať všetky technické zlyhania počas práce s geneticky modifikovanými organizmami.

2. Scenáre reprezentatívnych druhov havárií

a) plány na ochranu ľudského zdravia a životného prostredia

Zamestnanci sú povinní dodržiavať ochranné opatrenia, zásady správnej mikrobiologickej praxe vyplývajúce z platnej legislatívy na úseku GMO, prevádzkový poriadok laboratória, zásady bezpečnosti práce a protipožiarnej ochrany v infekčnom prostredí. Pravidelne sa zúčastňujú školení vedúcich projektov, bezpečnosti a ochrany zdravia pri práci a požiarnej ochrany, v zmysle termínov stanovených zákonom sa zúčastňujú pravidelných preventívnych lekárskech prehliadok. Vykonávanie preventívnych dekontaminácií pracovných priestorov (laminárne boxy) UV svetlom a čistenie laboratórnych stolov dezinfekčnými roztokmi. Okná sú mechanicky zabezpečené pred otvorením. Odpadom sú kultivačné médiá. Mediá a odpady z pracovných priestorov sú sterilizované autoklávovaním priamo v zariadení.

Pri manipulácii s geneticky modifikovanými organizmami a mikroorganizmami nehrozí pracovníkom ani životnému prostrediu žiadne významné nebezpečenstvo.

b) metódy na izoláciu oblastí postihnutých rozšírením

Manipulácia s GMO a genetickými technológiami sa bude vykonávať v uzavretých priestoroch, ktoré sú izolované od ostatných priestorov. Pravdepodobnosť úniku do okolitého životného prostredia, mimo zariadenia, je minimálna. Ak by takáto situácia nastala, prežitie GMO a ich rast mimo laboratórnych podmienok je nepravdepodobný.

V uzavretých priestoroch je potrebné sa presvedčiť, či sa kontaminant nešíri cez uzavretú oblasť, ďalej postupovať podľa bodu 2 písm. c).

c) metódy na dekontamináciu postihnutých osôb a miestností

Odporúčaná postup pri neželanom úniku je dôsledná dezinfekcia. Ako dezinfekciu možno použiť 70% alkohol, ktorý je v laboratóriách pripravený aj na tento účel, a je vhodný aj na povrchovú dezinfekciu osôb. Na dezinfekciu uzavretého priestoru možno použiť aj iný dezinfekčný prostriedok (5% SAVO – 1 hod., 3% roztok chloramínu B – 30min, alebo 1% ajatin – 30 min), prípadne zdroj UV žiarenia.

Všetky použité nádoby aj nástroje použité na dekontamináciu je potrebné klasifikovať ako kontaminovaný odpad a následne dezinfikovať tiež pomocou chemických dezinfekčných prostriedkov alebo autoklávovaním.

Príklady metód na dekontamináciu v RT2 sú uvedené v nasledovnej tabuľke:

Úroveň ochrany: 2			
Názov bariéry: sklenený materiál			
č.	Možné úniky	Inaktivačné opatrenia	Preventívne opatrenia
1.	Rozbitá sklenená nádoba v pracovnom priestore.	Po nasadení gumených rukavíc a ochranných okuliarov opatrne pozbierame rozliaty obsah aj s rozbitým sklom do nádoby, kde bude zachytený materiál inaktívovaný 2 % roztokom Chloramínu T/30 minút (70%-ný etanol/30 minút). Rovnako bude inaktívovaný aj ostatný materiál, ktorý prišiel do kontaktu s GMO. Dezinfekčným roztokom dôkladne umyjeme miesto, ktoré bolo postihnuté ako aj náradie použité pri odstraňovaní odpadu. Nádobu s inaktívovaným materiálom (vrátane inaktívovaného ostatného materiálu) a náradie použité pri odstraňovaní sterilizujeme autoklavovaním. Dbáme na zvýšenú opatrnosť pri práci so sklom. V prípade poranenia (porezanie, pichnutie) necháme ranu krváčať tak dlho ako je to možné, potom opláchneme pod tečúcou vodou a následne opláchneme 70% alkoholom alebo jódovou tinktúrou. V prípade, že boli zasiahnuté oči, ústa a iné,	Pohotovostná zásoba dezinfekčného činidla a prostriedkov na odstránenie úniku v laboratóriu a v kultivačnej miestnosti. Pravidelná kontrola a údržba upevňovacích mechanizmov kultivačných zariadení. Dôkladný výber dodávateľa dostatočne pevných kultivačných nádob. Poučenie pracovníkov o bezpečnej eliminácii úniku.

		opláchneme ich väčším množstvom vody. Vyhľadáme lekársku pomoc. Úraz zapíšeme do knihy úrazov.	
Názov bariéry: poškodenie nádob s mikroorganizmami			
2.	Únik mikroorganizmov do pracovného prostredia.	Postrek priestorov doporučenými dezinfekčnými aerosólovými prostriedkami (Sanosil, Persteril). Priestor uzavrieť na požadovanú dobu podľa druhu dezinfekčného prostriedku. Dôkladná hygienická očista ľudí s odporúčením použitia dezinfekčných saponátov. Ďalší postup ako v bode č.1.	Najmenej 1 – krát ročne postrek priestorov aerosólovými dezinfekčnými prostriedkami. Zvýšená pozornosť pri práci s mikroorganizmy obsahujúcim materiálom. Sterilizácia laboratórií použitím germicídneho žiariča mimo pracovnej doby minimálne 1 krát týždenne. Pravidelná sterilizácia vzduchu v laboratóriu použitím vysokonapäťového filtračného zariadenia.
Názov bariéry: plastový materiál			
3.	Prasknutý plastový materiál (na jednorazové použitie)	V gumených rukaviciach vložiť plastový materiál do nádoby, kde bude inaktivovaný 2 % roztokom Chloramínu T /30 minút a následne sterilizovaný autoklávaním. Dezinfekčným roztokom dôkladne poumývať postihnuté okolie.	Dôkladná kontrola plastov pred ich použitím. Náležitú pozornosť venovať výberu vhodnosti druhu plastov pre účel použitia. Nepoužívať plasty po záručnej dobe.
Názov bariéry: vniknutie vektorov			
4.	vniknutie hlodavcov, hmyzu, článkonožcov	Ošetrovanie priestorov insekticídmi (Famid). Ošetrovanie priestorov rodenticídmi a nástrahami (Baraky).	Pravidelne najmenej 2 – krát ročne kontrola priestorov, vykonávanie preventívnych ošetrovaní insekticídmi, nasadenie rodenticídnych nástrah.

d) metódy a postupy na kontrolu geneticky modifikovaných organizmov pre prípad havárie,

V prípade možnej kontaminácie biologického materiálu, kedy by mohlo dôjsť k vneseniu cudzorodých DNA sekvencií postupovať nasledovne:

- odobrať vzorku kontaminovaného biologického materiálu
 - izolovať DNA
 - pomocou špecifických primerov detegovať príslušné sekvencie PCR metódou
 - v prípade potvrdenia prítomnosti DNA sekvencií v danom organizme pristúpime k likvidácii biologického materiálu :
 - geneticky modifikované organizmy určené na likvidáciu sú inaktivované na mieste v laboratóriu vhodným dezinfekčným roztokom roztoku (Chloramin T 2% /30 minút, Etanol 70%/30 minút, Savo 5%/1 hodina), následne sa sústreďujú v nádobách na to určených. Sterilizácia biologického odpadu sa bude uskutočňovať autoklávaním pri teplote 121 °C počas 30 minút.
- Inaktivovaný materiál a biologický odpad sa likviduje v zdravotníckej spaľovni.

e) opis možných následkov havárie a jej bezprostredných konkrétnych vonkajších účinkov na zamestnancov používateľa, ako aj na obyvateľstvo a životné prostredie,

Vzhľadom k tomu, že GMO A a GMM B obsahujú lentivírus, predstavujú tieto bunky potenciálne nebezpečenstvo pre človeka, zvlášť pri vdýchnutí, požití a priamej injeckácii.

Šírenie GMO A a GMM B mimo špecifických podmienok je však možné označiť za nepravdepodobné.

Pravdepodobnosť úniku do okolitého životného prostredia mimo zariadenia, je minimálna. Ak by takáto situácia nastala, ich prežitie a rast mimo laboratórnych podmienok je nepravdepodobný.

f) metódy na zneškodnenie alebo sanáciu najmä rastlín, zvierat, pôdy, ktoré boli vystavené pôsobeniu geneticky modifikovaných organizmov počas havárie a po havárii,

GMO A a GMM B nemajú šancu prežiť mimo špecifických podmienok sterilného boxu a špeciálnych kultivačných roztokov.

Stavebno-technické usporiadanie laboratórií a v nich zavedený systém bezpečnostných opatrení nedovoľujú, aby GMO A a GMM B prišli do kontaktu s rastlinami, zvieratami a pôdou, ani počas prípadnej havárie.

g) opis odporúčaného správania zamestnancov v zariadení a obyvateľstva v blízkosti zariadenia, v ktorom sa používajú génové metódy a génové techniky, pri styku s geneticky modifikovanými organizmami, ktoré unikli počas havárie:

- Ak nastala havária treba okamžite informovať podľa bodu 1 písmena c) havarijného plánu.
- Bezodkladne upovedomiť ohrozené osoby.
- Vykonať opatrenia zamerané na likvidáciu uniknutého GMO podľa bodu 2 a), b), c), d) /scenáre reprezentatívnych druhov havárií/.
- 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 jódomou tinktúrou. Pokiaľ boli zasiahnuté oči, ústa a iná časť tela, opláchnuť ich väčším množstvom vody.
- Vyhľadať lekársku pomoc.

- Ak havária môže mať cezhraničné vplyvy, informovať okrem ministerstva aj orgány ohrozených štátov.
- Podat' ohlásenie ministerstvu.
- Haváriu písomne zaznamenať.
- Vedúci projektu vykoná opatrenia, aby sa udalosť neopakovala.
- Poskytnúť informácie o vykonaných opatreniach verejnosti vhodnou formou zverejnenia.

Príklad 1:

Postup v prípade kontaminácie priestoru geneticky modifikovanými bunkami, vírusmi a plazmidovou DNA.

- ak je to možné, odstrániť všetky prekážky z kontaminovanej oblasti
- ak je to možné, čakať 15 min, aby došlo k usadeniu aerosólov
- nedotýkať sa ostrých predmetov
- presvedčiť sa, či sa kontaminant nešíri cez uzavretú oblasť, ktorá sa vytvorila dezinfekčnou látkou, dezinfikovať celú oblasť
- zakryť kontaminovaný materiál alebo povrch papierovou vatou alebo filtračným papierom, ktorý bol namočený v 70% alkohole
- po 10 minútach filtračný papier odstrániť a umiestniť medzi biologický odpad
- opäť prikryť kontaminovaný materiál filtračným papierom, aby nasal tekutinu
- opakovať tento postup pokiaľ nie je tekutina dokonale absorbovaná
- vyčistiť postihnutú oblasť opäť 70% alkoholom
- vyčistiť všetok materiál a povrch najprv vodou a mydlom, a potom dezinfekčným roztokom (70% alkohol)
- všetko kontaminované oblečenie dezinfikovať alebo autoklávovať
- kontaminovanú pokožku umyť mydlom a dezinfikovať 70% alkoholom