Stand: Datum

**Betriebsanweisung**

gemäß § 17 Abs. 2 GenTSV

**für gentechnische Arbeiten in Laboren der**

**Sicherheitsstufe 2**

Inhalt

[1. Geltungsbereich 2](#_Toc484698048)

[2. Erste Hilfe/ Verhalten im Gefahrfall 2](#_Toc484698049)

[2.1. Verletzungen 2](#_Toc484698050)

[2.2. Verhalten bei Feuer 2](#_Toc484698051)

[2.3. Austreten von biologischem Material 2](#_Toc484698052)

[2.4. Energieausfall 2](#_Toc484698053)

[3. Benannte Personen 3](#_Toc484698054)

[4. Gentechnische Arbeiten 3](#_Toc484698055)

[4.1. Risikobewertung und Aufzeichnungen 3](#_Toc484698056)

[4.2. Lagerung und Transport von GVOs 3](#_Toc484698057)

[4.3. Entsorgung von GVOs und kontaminierten Abfällen 3](#_Toc484698058)

[5. Zugangsregelungen, Unterweisungen, Arbeitsmedizinische Vorsorge 4](#_Toc484698059)

[6. Allgemeine Vorschriften, Verhaltensregeln und Schutzmaßnahmen 4](#_Toc484698060)

[6.1. Persönliche Schutzausrüstung 4](#_Toc484698061)

[6.2. Verhaltensregeln 4](#_Toc484698062)

[6.3. Arbeiten mit transgenen Tieren im Labor 5](#_Toc484698063)

[6.4. Zusatzregelungen 5](#_Toc484698064)

[6.5. Verbote 6](#_Toc484698065)

[7. Hygienische Maßnahmen 6](#_Toc484698066)

## Geltungsbereich

|  |  |
| --- | --- |
| Aktenzeichen der Anlage: | 40611/xxx/xxx |
| Räume | Raumnummern und Funktion (z.B. Labore: 01 D3 234, 235, 236; Spülküche: 01 D3 237, Lagerraum: 01 D3 238 usw.)  |

Die Räume der gentechnischen Anlage sind mit Sicherheitsstufe 2, dem Biohazard-Symbol und der Zugangsbeschränkung gekennzeichnet.

## Erste Hilfe/ Verhalten im Gefahrfall

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Erste Hilfe Kasten | Raum xx |
| Notaufnahme Klinikum | 8605 oder 8813 (Pieper: 919-4112) |
| Feuer/Notarzt | 112 |
| Störmeldezentrale | 20000 |
| Giftnotrufzentrale | 22032 |

* Ruhe bewahren und überstürztes, unüberlegtes Handeln vermeiden.
* Gefährdete Personen warnen, gegebenenfalls zum Verlassen der Räume auffordern.
* Gefährdete und gefährliche Versuche beenden, ggf. Gas, Strom und Wasser abstellen.(Die Notabschaltung für xx befindet sich xx; ggf. muss Kühlwasser weiterlaufen).
* Verletzungen sind unverzüglich dem Projektleiter zu melden und im Verbandsbuch wo zu finden? zu dokumentieren.
* Alarmblatt beachten, siehe Aushänge!

### Verletzungen

1. Kontaminierte Hautstellen desinfizieren Womit? Konzentration? Einwirkzeit?
2. Augen und Schleimhäute ausgiebig (mindestens 5 Minuten) mit viel fließendem Wasser spülen. Augenduschen befinden sich *wo?*.
3. Treten trotz dieser Sofortmaßnahmen weitere Beschwerden auf, so ist umgehend die Tagespflege/Nachtaufnahme (TN) UBFT, Ebene 01, Aufzug C 1 aufzusuchen (Telefon 8605 oder 8813). Konsultierte Ärzte sind über die Möglichkeit einer Infektion mit biologischem Material zu unterrichten.

### Verhalten bei Feuer

* Als Hauptfluchtwege sind die Wege xx vorgesehen.
* Der Feuerwehrplan befindet sich *wo?*.
* Feuerlöscher befinden sich in den Räumen xx.
* Falls Kleidung Feuer gefangen hat, die Personendusche *wo?* benutzen.

Nach leichten Verbrennungen und Verbrühungen sind die betroffenen Hautpartien unverzüglich mindestens 10 Minuten unter fließendes kaltes Wasser oder in Eis (Eismaschine) zu halten.

### Austreten von biologischem Material

Werden Organismen verschüttet, muss unverzüglich der kontaminierte Bereich gesperrt und desinfiziert werden. Größere kontaminierte Flüssigkeitsmengen werden mit saugfähigem Material aufgenommen und anschließend autoklaviert. Die Desinfektion erfolgt gemäß dem Hygieneplan.

### Energieausfall

Bei einem Energieausfall sind die Arbeiten in der Sicherheitswerkbank unverzüglich einzustellen. Gefäße sind auslaufsicher zu verschließen. Die Frontscheibe der Sicherheitswerkbank ist zu schließen. Vor Wiederaufnahme der Arbeiten sind Geräte, Außenflächen von Gefäßen und Arbeitsflächen mit einem geeigneten Desinfektionsmittel zu desinfizieren.

## Benannte Personen

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Projektleiter/in | Name | Telefon |
| Projektleiter Stellvertreter | Name | Telefon |
| BBS | Name | Telefon |
| Sicherheitsbeauftragte/r | Name | Telefon |
| Strahlenschutzbeauftragte/r | Name | Telefon |
| Laserschutzbeauftragte/r | Name | Telefon |

## Gentechnische Arbeiten

In der gentechnischen Anlage werden gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 mit folgenden Themen durchgeführt:

Bitte genutzte Organismen mit Risikogruppe angeben! Hier bitte auch die weiteren angezeigten S2 Arbeiten mit Aktenzeichen und auflisten, die im S2 Labor durchgeführt werden. Inklusive der Angabe welche S2 Organismen genutzt werden.

Zu den gentechnischen Arbeiten zählen neben der Erzeugung auch die Verwendung, Vermehrung, Lagerung, Zerstörung oder Entsorgung sowie der innerbetriebliche Transport von gentechnisch veränderten Organismen (GVO).

### Risikobewertung und Aufzeichnungen

Vor Aufnahme der geplanten gentechnischen Arbeiten erstellt die Projektleitung eine Risikobewertung, aus der sich die Zuordnung der Arbeiten zur Sicherheitsstufe 2 ergibt. Diese Risikobewertung ist ebenso wie die Dokumentation der Erzeugung und Lagerung der GVOs Bestandteil der Aufzeichnungen gemäß Gentechnik-Aufzeichnungs-verordnung. Die Aufzeichnungen sind fortlaufend und zeitnah zu führen und müssen 30 Jahre aufbewahrt werden.

### Lagerung und Transport von GVOs

* + 1. Die Lagerung gentechnisch veränderter Organismen hat in geeigneten Behältern zu erfolgen. Zwecks sicherer Zuordnung erfolgt die Kennzeichnung der Gefäße durch dauerhafte Beschriftung / Etiketten.

Die Lagerung von Bakterien bei -xx°C erfolgt im Tiefkühlschrank im Raum …

Die Lagerung von Zellen/Viren bei -80°C erfolgt im Tiefkühlschrank im Raum …

Die Lagerung von Zellen/Viren etc. in flüssigem Stickstoff erfolgt im Raum …

* + 1. **Geräte zur Lagerung** **für S2 GVOs** sind mit S2 und dem Biohazard-Symbol zu kennzeichnen. Die Zugangsbeschränkung gilt auch für Tiefkühlschränke: stehen diese außerhalb des S2 Bereichs müssen sie verschlossen sein.
		2. Für den **innerbetrieblichen Transport** von gentechnisch veränderten Organismen sind verschlossene, bruchsichere, autoklavierbare und mit S2 sowie dem Biohazard-Symbol gekennzeichnete Behältnisse zu verwenden. Hierfür stehen die Behälter im Raum xx zur Verfügung.

### Entsorgung von GVOs und kontaminierten Abfällen

1. Alle mit gentechnisch veränderten Organismen kontaminierten flüssigen und festen Abfälle werden für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Abfallbehälter sind mit S2 und dem Biohazard Symbol markiert. Folgende Autoklaven stehen zur Verfügung:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Modell | Etage | Raum |
|  |  |  |

1. Ausstattung und **Funktionsprüfung Autoklav** in S2:

Der Autoklav muss über ein fraktioniertes Vorvakuum, eine Kondensatinaktivierung und eine Abluftfiltration verfügen. Die Filterkerze wird gemäß Herstellerangaben alle xxx Läufe (oder alle xx Monate) gewechselt.

Die Funktionsfähigkeit des Autoklavs ist halbjährlich durch geeignete Bioindikatoren zu überprüfen und zu dokumentieren.

1. Bei Tätigkeiten mit transgenen Tieren:

Tiere, welche mit pathogenen Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Viren) infiziert wurden werden nach der Tötung zusätzlich autoklaviert.

Die Entsorgung von Tierkadavern findet entsprechend dem Tierische Nebenprodukte-Beseitigungsgesetz (TierNebG) durch thermische Inaktivierung statt. Die Tierkadaver werden bis zur Abholung tiefgefroren. Die Sammelstelle befindet sich in Raum xx. Die mit den transgenen Tieren in Kontakt gekommenen festen Abfälle (Papiertücher, Handschuhe usw.) werden autoklaviert.

1. Radioaktive Abfälle:

Radioaktive und mit GVOs kontaminierte Abfälle dürfen nicht autoklaviert werden! Die Art der Entsorgung (nach Strahlenschutzverordnung und/oder nach GenTSV) richtet sich nach der Stärke der jeweiligen Kontamination!

## Zugangsregelungen, Unterweisungen, Arbeitsmedizinische Vorsorge

1. **Zutritt** zum Labor haben nur Personen, die vom Projektleiter oder durch von ihm autorisierte Dritte hierzu ermächtigt wurden. Alle Mitarbeiter sind nachweislich vor Aufnahme der Tätigkeit und weiterhin mindestens jährlich über die erforderlichen und projektspezifischen Sicherheitsmaßnahmen arbeitsplatzbezogen anhand der Betriebsanweisung zu unterweisen. Dies ist durch Unterschrift zu bestätigen.
2. **Reinigungs-, Wartungspersonal** darf in den Laboratorien nur tätig werden, wenn es vor Aufnahme der Arbeit seiner Tätigkeit entsprechend unterwiesen ist.
3. **Arbeitsmedizinische Vorsorge:** bei Arbeiten mit bestimmten humanpathogenen Organismen (siehe ArbMedVV, Anhang Teil 2) ist eine Pflicht- bzw. Angebotsuntersuchung durchzuführen.

## Allgemeine Vorschriften, Verhaltensregeln und Schutzmaßnahmen

Nach den Grundregeln guter mikrobiologischer Technik und den Regelungen der Gentechnik-Sicherheitsverordnung ist insbesondere Folgendes zu beachten:

### Persönliche Schutzausrüstung

1. In Arbeitsräumen sind Laborkittel oder andere Schutzkleidung zu tragen. Die Schutzkleidung ist beim Verlassen der gentechnischen Anlage abzulegen und getrennt von der Straßenkleidung aufzubewahren. Schutzkleidung aus dem S1 und S2 Bereich darf nicht identisch sein und wird getrennt voneinander aufbewahrt.
2. Einmalhandschuhe sind nach Gebrauch zu entsorgen. Kontaminierte Einmalhandschuhe sind vor der Entsorgung als Festabfall zu autoklavieren.

### Verhaltensregeln

* + 1. Fenster und Türen müssen während der Arbeiten geschlossen sein.
		2. Die Nutzung der im S2 Gentechnik-Arbeitsbereich vorhandenen **Schreibarbeitsplätze** ist auf die Protokollierung der Versuche sowie dazugehörige Dokumentationen beschränkt. Es sind keine dauerhaften Schreibarbeitsplätze gestattet!
		3. Vor Aufnahme der Arbeiten hat sich jeder Beschäftigte des Labors über Standort und Funktion von Desinfektionsmitteln, Körper- und Augenduschen, Erste-Hilfe-Einrichtungen, Feuerlöscheinrichtungen sowie über Flucht- und Rettungswege zu informieren.
		4. Die Räume der gentechnischen Anlage sind aufgeräumt und sauber zu halten. Auf den Arbeitstischen sollen sich nur die tatsächlich benötigten Geräte und Materialien befinden.
		5. Es sind Pipettierhilfen zu benutzen.
		6. Spritzen, Kanülen, Klingen, Nadeln, Lanzetten etc. dürfen nur, wenn unbedingt nötig benutzt werden. Zur Entsorgung sind sie in durchstoßsicheren autoklavierbaren Behältnissen zu sammeln und zu autoklavieren. Recapping ist verboten.
		7. **Aerosolbildung** ist zu vermeiden. Arbeiten, bei denen Aerosole entstehen können, sind stets unter einer Sicherheitswerkbank oder in aerosoldichten Gefäßen/Geräten bzw. Geräten mit Abluftfiltrierung (siehe Punkt h) durchzuführen, damit die Aerosole nicht in den Arbeitsbereich gelangen können. Laborabzüge ohne HEPA-Filter dürfen für diese Arbeiten NICHT genutzt werden. Mit Aerosolbildung ist z. B. beim Umfüllen, Rühren, Hochdruckpressen, Beimpfen, Schütteln, Pipettieren, Zentrifugieren, Öffnen von Röhrchen mit Flüssigkeiten aus der -80°C oder Flüssig-Stickstoff Lagerung und Arbeiten mit Ultraschall (etc.) zu rechnen.
		8. Die **Zentrifugation von S2-Organismen** muss in aerosoldichten Zentrifugationsgefäßen (mit Dichtring, maximale Füllmenge beachten) durchgeführt werden. Zentrifugengefäße dürfen ausschließlich unter der Sicherheitswerkbank geöffnet werden! Gradientenzentrifugationen dürfen nur in verschweißten („Ultra-Seal“) Zentrifugenröhrchen vorgenommen werden. Es ist darauf zu achten, dass die Deckeldichtungen von Zentrifugenrotoren eingefettet sind, um bei Undichtigkeit von Zentrifugenröhrchen den Austritt von kontaminierendem Material aus der Rotorkammer zu verhindern. Zeigt die Zentrifuge einen Fehler des Vakuumsystems an, kann dieser theoretisch durch einen defekten, undichten Rotor verursacht worden sein. Die Rotorkammer auf 0°C abkühlen um Aerosole niederzuschlagen, den Rotor nur unter einer sterilen Werkbank öffnen und die Rotorkammer gemäß Hygieneplan desinfizieren.
		9. Die Identität der benutzten Organismen ist regelmäßig zu überprüfen, wenn dies für die Beurteilung des Gefährdungspotentials notwendig ist. Die zeitlichen Abstände richten sich nach dem möglichen Gefährdungspotential.
		10. Die vorhandenen Betriebsanweisungen für Geräte und Gefahrstoffe sind zu beachten.

### Arbeiten mit transgenen Tieren im Labor

* + 1. Transport der Tiere (innerbetrieblich), Kennzeichnung der Käfige zur Identifizierung der transgenen Tiere
		2. persönliche Schutzausrüstung der Mitarbeiter, Verhaltensregeln, Hygienemaßnahmen
		3. Verhalten bei Biss-, Kratz-, Stichwunden
		4. Einsatz von Maßnahmen gegen das Entweichen der Tiere (z.B. Nagersperren während der Arbeiten vor den Türen)

### Zusatzregelungen

* + 1. Umgang mit **Flüssigstickstoff**:

Es besteht die Gefahr, dass der Sauerstoffgehalt der Raumluft durch Beimischung von Stickstoff gefährlich absinkt. Dies kann ohne Vorwarnung zu Bewusstlosigkeit und schließlich zum Erstickungstod führen. Weitere Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit LN2 (z.B. zur Vermeidung von „Kälteverbrennungen“) sind in der ergänzenden Betriebsanweisung festgelegt.

* + 1. **Nukleinsäuren mit onkogenem bzw. transformierendem Potential** (siehe ZKBS-Stellungnahmen 6790-10-01 und 6790-10-36):
* Bei Arbeiten mit Nukleinsäuren mit dem o. g. Gefährdungspotential sollen Einmalhandschuhe getragen werden.
* Der Gebrauch von scharfen, spitzen oder zerbrechlichen Laborgegenständen soll nach Möglichkeit vermieden werden.
* Laborplatz und Laborgeräte, die mit diesen Nukleinsäuren in Berührung kommen, sollen nach Beendigung der Tätigkeit sorgfältig gereinigt werden.
* Laborabfälle, die solche Nukleinsäuren enthalten, sollen durch Autoklavieren oder chemisch denaturiert werden.
* Personen mit erheblichen Hautverletzungen (offene Ekzeme, Wunden und Infektionen) oder mit einer ausgeprägten Verrucosis (Warzenausbildung) sollten keine Arbeiten mit diesen Nukleinsäuren durchführen
	+ 1. **Adenoviren und AAV, die potentielle Onkogene übertragen** (ZKBS Stellungnahme 6790-10-83):
* die Sicherheitswerkbank, in der diese Arbeiten durchgeführt werden, ist entsprechend zu kennzeichnen
* Gefäße und Geräte, die aus der Sicherheitswerkbank entfernt werden, sind zuvor von außen mit einem geeigneten Desinfektionsmittel zu desinfizieren
* die Belüftung von Zellkulturflaschen, in denen die viralen Partikel vorliegen, hat erst im CO2-Brutschrank zu erfolgen, um das Austreten von Kulturflüssigkeit zu vermeiden
* während der Arbeiten sind Schutzhandschuhe zu tragen, die Schutzhandschuhe sind regelmäßig zu desinfizieren oder zu wechseln
* beim Umgang mit diesen viralen Partikeln ist das Tragen eines Atemschutzes mit einem Rückhaltevermögen der Klasse 3 zu tragen.

**Alternativ** können gentechnische Arbeiten mit den o. g. viralen Partikeln unter folgenden Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt werden:

* + Gentechnische Arbeiten mit den viralen Partikeln, bei denen Aerosole entstehen können, sind in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (MSW) der Klasse III durchzuführen.
	+ Die viralen Partikel müssen in dicht verschlossenen, bruchsicheren und von außen desinfizierten Behältern eingeschlossen sein. Das Öffnen, Verschließen und Desinfizieren mit einem geeigneten Desinfektionsmittel hat in einer MSW Klasse III zu erfolgen.
		1. **Retrovirale Vektoren und potentielle Onkogene** (ZKBS Stellungnahme 6790-10-41):

Werden bei gentechnischen Arbeiten zur Übertragung von Nukleinsäureabschnitten mit onkogenem Potenzial retrovirale Vektoren verwendet, welche durch Pseudotypisierung eine verstärkte Partikelstabilität oder ein Wirtsspektrum für humane Epithelzellen erhalten oder welche durch ein verändertes Glykosylierungsmuster durch das humane Komplementsystem nicht erkennbar sind, wird zur Vermeidung einer Schmierinfektion empfohlen, zusätzlich zu den Maßnahmen der Sicherheitsstufe 2, einen Mund- und Nasenschutz zu tragen

* + 1. **Rückstufung** von transduzierten Zellen:

Bevor Zellen nach viraler Transduktion vom S2-Bereich in einen S1-Bereich transferiert werden, müssen folgende Bedingungen eingehalten werden: Durch xx Waschschritte/Passagieren nach der Transduktion wird ein Verbleiben viraler Partikel im Überstand der Zellkultur ausgeschlossen. Die Partikelfreiheit muss experimentell nachgewiesen sein.

### Verbote

* + 1. Nahrungs- und Genussmittel sowie Kosmetika dürfen nicht innerhalb der Laboratorien aufbewahrt werden. In den Arbeitsräumen darf nicht gegessen, getrunken, geraucht oder geschnupft werden. Der Pausenraum darf nicht mit Laborschutzkleidung betreten werden.
		2. Mundpipettieren ist untersagt.
		3. Gasflaschenlagerung ist nicht gestattet. Zwingend erforderliche Druckgasflaschen sind gemäß den TRGS 526, Ziff. 5.2.11 aufzustellen, zu behandeln und insbesondere gegen Umstürzen zu sichern.
		4. Gegebenenfalls weitere Verbote benennen

## Hygienische Maßnahmen

1. Bei Arbeiten mir gentechnisch veränderten Organismen ist ein **Hygieneplan** zu erstellen, der eine Kurzübersicht der zu beachtenden Hygienemaßnahmen z.B. mit zeitlichen Vorgaben hinsichtlich der Mittel und der Anwendungsmethoden enthält. Es sind wirksame Desinfektionsmittel und -verfahren auszuwählen.
2. Nach Beendigung der Tätigkeit und vor Verlassen des Arbeitsbereiches müssen die Hände gemäß **Hautschutzplan** ggf. desinfiziert, sorgfältig gewaschen und rückgefettet werden.
3. Hygiene- und Hautschutzplan sind an geeigneter Stelle in der Anlage auszuhängen oder müssen anderweitig leicht verfügbar sein.
4. Bei Verwendung der alkoholischen Desinfektionsmittel ist insbesondere an elektrisch betriebenen Geräten und Anlagen in Verbindung mit offenen Flammen/heißen Oberflächen der Explosionsschutz zu beachten. Während des Ausbringens von alkoholischen Desinfektionsmitteln muss der Raum ausreichend be- und entlüftet werden. Die Anwendung alkoholischer Desinfektionsmittel ist auf maximal 50 ml Gebrauchslösung je m² zu behandelnder Fläche zu beschränken.
5. Vor Reinigungs-, Instandsetzungs- und Änderungsarbeiten an Geräten oder Einrichtungen (z.B. Sicherheitswerkbänken), ist eine Desinfektion gemäß Hygieneplan vorzunehmen.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | **Ort, Datum** | **Unterschrift** |
| **Projektleiter/in** |  |  |
| **BBS** |  |  |