



CENTRUM  
**BIOVIED**  
SLOVENSKÁ  
AKADÉMIA VIED

Dúbravská cesta 9, 840 05 Bratislava

organizačná zložka

**Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV**

## **PREVÁDZKOVÝ PORIADOK PRE PRÁCU S CHEMICKÝMI FAKTORMI**

NV SR č. 355/2006 Z. z. o ochrane zamestnancov pred rizikami súvisiacimi  
s expozíciou chemickým faktorom pri práci v znení NV SR č. 82/2015

NV SR č. 356/2006 Z. z. o ochrane zdravia zamestnancov pred rizikami súvisiacimi  
s expozíciou karcinogénnym a mutagénnym faktorom pri práci v znení NV SR č. 83/2015

**Oddelenie fyziológie a etológie  
Ústav biochémie a genetiky živočíchov CBv SAV**

<b>Dátum</b>	<b>Schválila</b>	<b>Vypracovala</b>
Bratislava, jún 2017	Ing. Zdena Sulová, DrSc. riaditeľka CBv SAV	Gizela Gajdošíková technička BOZP

## Obsah

1. Opis pracovných priestorov a ich umiestnenie	3
2. Nebezpečné chemické faktory používané v laboratóriách	8
3. Popis vybraných pracovných činností v laboratóriách, pri ktorých sa používajú vyššie uvedené nebezpečné chemické faktory	14
4. Pravidlá pre prácu s chemickými faktormi v laboratóriách	19
5. Uchovávanie chemických faktorov	20
6. Označovanie chemických faktorov	20
7. Likvidácia chemických faktorov	20
8. Udalosť, nehoda a porušenie pravidiel	21
9. Postup v prípade kontaminácie priestoru rizikovým faktorom	24
10. Ochranné a preventívne opatrenia	24

## **1. Opis pracovných priestorov a ich umiestnenie**

**Miestnosti** č. 1.05, 1.06, 1.07, 1.08, 1.09., 1.10, 1.34, 1.35, 1.37, 1.42, 1.43, 1.46 sa nachádzajú na I. podlaží budovy súpisné číslo 5788 v areáli SAV na Dúbravskej ceste 9 v Bratislave.

### **Miestnosť č. 1.04 – Šatňa ženy**

Miestnosť má omietkové steny, PVC podlahu, otvárateľné okno a umelé osvetlenie. Slúži na prezlečenie sa do pracovného ochranného odevu. Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

### **Miestnosť č. 1.36 – Šatňa muži**

Miestnosť má omietkové steny, PVC podlahu, otvárateľné okno a umelé osvetlenie. Slúži na prezlečenie sa do pracovného ochranného odevu. Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

### **Miestnosť č. 1.41 – Denná miestnosť**

Miestnosť bez prirodzeného vetrania a osvetlenia. Je vybavená kuchynskou linkou, jedálenskými stolmi so stoličkami, chladničkou. Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami a vetranie zabezpečuje centrálna vzduchotechnika. Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

### **Miestnosť č. 1.05 - Laboratórium aviárnej fyziológie**

Miestnosť má vykachličkované steny do výšky 1,8 m, prirodzené osvetlenie a vetranie cez otvárateľné okná s možnosťou tienenia. Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Umelé vetranie zabezpečuje centrálna vzduchotechnika s nastaviteľnou teplotou v miestnosti. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a laboratórnym drezom.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

### ***Vybavenie pracoviska***

V centre laboratória sa nachádza obojstranný mokrý laboratórny stôl s policovou nadstavbou a s laboratórnym drezom. Na stole v pravej časti laboratória je umiestnený pH meter, vodný a olejový kúpeľ a inkubátor. Vedľa stola je digestor so skrinkou na kyseliny a lúhy. Pri stene na ľavej strane sa nachádza pracovný stôl, na ktorom sú umiestnené drobné prístroje: váhy, vortex, magnetické miešadlo s ohrevom, minicentrifúga, trepačky a malý stolový sterilizátor. Nad stolom sú nástenné skrinky s príručnými chemikáliami a s pracovnými pomôckami. Pod všetkými stolmi sú skrinky s pracovnými pomôckami. Vedľa stola vľavo je umiestnená chladnička využívaná na skladovanie pracovných roztokov, chemikálií, vzoriek a podobne.

V laboratóriu sa vo väčšine prípadov manipuluje s nebezpečnými chemickými látkami v kvapalnej podobe s veľmi nízkou koncentráciou nebezpečnej chemickej látky (mg/ml, µg/ml,..) a používané množstvá na manipuláciu sa pohybujú v µl, resp. ml objemoch (NCHL: butaklamol, haloperidol, spiperón, apomorfín, sulpirid, quinpirol, kyselina iboténová, paraformaldehyd, DAPI, cytozín -β-D- arabinofuranozid, merkaptoetanol, formamid, etídiumbromid, hematoxilín, krezolová violeť).

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do kategórie CH – 2.

### **Miestnosť č. 1.06 – Predsieň sterilného boxu pre prácu s aviárnymi embryami a bunkovými kultúrami**

Miestnosť s vykachličkovanými stenami do výšky 1,8 m, bez prirodzeného osvetlenia a vetrania. Umelé osvetlenie je zabezpečené stropným osvetľovacím telesom. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a nerezovým umývadlom. V miestnosti sa nachádza germicídny žiarič.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

#### ***Vybavenie pracoviska***

V miestnosti, ktorá spája laboratórium so sterilným boxom, sa nachádza umývadlo, manipulačný stôl a skrinka na stene s pracovnými pomôckami.

Pracovisko nie je miestom trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do kategórie CH – 2.

### **Miestnosť č. 1.07 - Sterilný box pre prácu s aviárnymi embryami a bunkovými kultúrami**

Miestnosť s vykachličkovanými stenami (do výšky 1,8 m), so zatemnenými oknami a s možnosťou otvoriť okno v prípade potreby. Umelé osvetlenie je zabezpečené stropným osvetľovacím telesom. Podlaha je pokrytá umývateľnou krytinou z PVC. V miestnosti sa nachádza germicídny žiarič.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Pracovisko nie je miestom trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do kategórie CH – 2.

Je to miestnosť so zvýšeným nebezpečenstvom vzniku požiaru.

#### ***Vybavenie pracoviska***

V laboratóriu sa po oboch stranách nachádzajú pracovné stoly a nástenné skrinky s pracovnými pomôckami. Na stoloch sú dva laminárne boxy, stolová centrifúga, mikroskop,

výveva a vortex. Je tu umiestnený inkubátor pre kultiváciu prepeličích embryí a CO<sub>2</sub> inkubátor pre kultiváciu bunkových kultúr s tlakovou CO<sub>2</sub> fľašou.

V laboratóriu sa vo väčšine prípadov manipuluje s malými množstvami chemických látok v kvapalnej podobe a s nízkou koncentráciou nebezpečnej chemickej látky (prevažné µg/ml, maximálne mg/ml). Používané množstvá na manipuláciu sa pohybujú v µl, resp. ml objemoch (formaldehyd).

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do kategórie CH – 2.

### **Miestnosť č. 1.08 Predsieň sterilného boxu pre kultiváciu bunkových kultúr**

Miestnosť s obkladom do výšky 1,8m bez prirodzeného osvetlenia a vetrania. Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Podlaha je pokrytá krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a umývadlom. V miestnosti sa nachádza germicídny žiarič so zapínaním v miestnosti 1.10.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

#### ***Vybavenie pracoviska***

V miestnosti sa nachádza mokrý laboratórny stôl s úložnými skrinkami v spodnej časti stola a nástennými skrinkami na uskladnenie laboratórneho plastu a pracovných roztokov, na ňom je umiestnená malá stolná centrifúga (Eppendorf), vortex.

Pracovisko nie je miestom trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do kategórie CH – 2.

### **Miestnosť č. 1.09 Sterilný box pre kultiváciu bunkových kultúr**

Miestnosť s obkladom do výšky 1,8m s prirodzeným osvetlením s možnosťou tienenia. Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Na strope je umiestnená germicídna lampa, so zapínaním v miestnosti 1.10. Podlaha je pokrytá krytinou z PVC.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Je to miestnosť so zvýšeným nebezpečenstvom vzniku požiaru.

#### ***Vybavenie pracoviska***

Laboratórium je vybavené chladničkou s mrazničkou na skladovanie pracovných roztokov, kultivačných médií, chemikálií, vzoriek a pod., pracovnými stolmi s mikroskopmi, a vyhrievacím stolíkom, ktoré sa využívajú pri manipulácii s gamétami a hybridómovými kultúrami pri in vitro kultivácii, CO<sub>2</sub> inkubátorom pre kultiváciu bunkových kultúr (do steny upevnená tlaková nádoba s CO<sub>2</sub> na vytvorenie vhodnej atmosféry v inkubačnom boxe), laminárnym boxom. Pracovisko nie je miestom trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do kategórie CH – 2.

### **Miestnosť č. 1.10 Laboratórium fyziológie reprodukcie**

Miestnosť s obkladom do výšky 1,8m, s prirodzeným osvetlením a vetraním cez otvárateľné okná. Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Umelé vetranie zabezpečuje centrálna vzduchotechnika s možnosťou nastavenia teploty v miestnosti. Podlaha je pokrytá krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody a umývadlom.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

#### ***Vybavenie pracoviska:***

Laboratórium je vybavené pracovnými stolmi, na ktorých sú umiestnené svetelné mikroskopy, analytické váhy, osmometer a laminárny box Alpina. V spodnej časti stolov a nad nimi sú úložné skrinky na uskladnenie plastu, laboratórneho skla, pracovných pomôcok a príslušenstva k drobným prístrojom. Uprostred miestnosti sa nachádza obojstranný mokrý laboratórny stôl, s úložnými skrinkami v spodnej časti a s policovou nadstavbou uprostred. Na stole sú umiestnené tri stolové centrifúgy, kývačky a trepačka, pH meter, elektroforetická aparátúra Protean mini, 2D elektroforetická aparátúra Multifor II. V úložných priestoroch pod stolom je uskladnené laboratórne sklo, plasty, pomôcky, na policiach uprostred stola bežné chemikálie, pracovné roztoky a pod. V zadnej časti miestnosti za laboratórnym stolom sú proti sebe umiestnené dva pracovné stoly, ktoré budú využívané pri manipulácii s mikroskopickými sklíčkami, spracovaní materiálu. Na pracovisku sa vykonávajú proteomické a imunochemické analýzy (elektroforetická separácia, western blot, imunoflorescenčná detekcia a pod.)

V laboratóriu sa vo väčšine prípadov manipuluje s biologickým materiálom (spermie, oocyty, krvné bunky, tkanivá), s malými množstvami chemických látok v kvapalnej podobe a s nízkou koncentráciou nebezpečnej chemickej látky (prevažne  $\mu\text{g/ml}$ , maximálne  $\text{mg/ml}$ ). Používané množstvá na manipuláciu sa pohybujú v  $\mu\text{l}$ , resp.  $\text{ml}$  objemoch (NCHL: akrylamid, merkptoetanol, iodoacetamid, tiomočovina, DAPI, metanol, paraformaldehyd, fenylmetylsulfonyl fluorid, digitonín, Sulfo-NHS-SS-Biotin).

Pracovisko nie je miestom trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do kategórie CH – 2.

### **Miestnosť č. 1.34. Mikroskopy**

Miestnosť s vybielenými umývateľnými stenami do výšky 1.5 m a zatemnenými oknami. Umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou krytinou z PVC.

#### ***Vybavenie pracoviska:***

Miestnosť je vybavená zostavou prístrojových laboratórnych stolov pre umiestnenie fluorescenčného mikroskopu, s úložným priestorom v spodnej časti a nástennými skrinkami. Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

### **Miestnosť č. 1.35. Sklad chemických látok**

Miestnosť s vybielenými umývateľnými stenami do výšky 1,5 m, bez prirodzeného osvetlenia a vetrania. Umelé osvetlenie zabezpečujú stropné osvetľovacie telesá. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou keramickou dlažbou. Miestnosť je odvetrávaná klimatizačnou jednotkou s rekuperátorom s trojnásobnou výmenou vzduchu za hodinu.

Miestnosť je označená príslušnými bezpečnostnými symbolmi.

Je to miestnosť so zvýšeným nebezpečenstvom vzniku požiaru.

#### ***Vybavenie pracoviska:***

Miestnosť je vybavená dvoma bezpečnostnými skriňami na horľaviny, polypropylénovou skriňou na kyseliny a lúhy, uzamykateľnou skrinkou na jedy a chladničkou na jedy.

Pracovisko nie je miestom trvalého pracovného výkonu.

Pracovné činnosti s chemickým faktorom sú zaradené do kategórie CH – 2.

### **Miestnosť č. 1.37. Fyzikálne laboratórium, príprava zmrazených rezov**

Miestnosť s vybielenými umývateľnými stenami do výšky 1,5 m, bez prirodzeného osvetlenia a vetrania. Umelé osvetlenie zabezpečujú stropné osvetľovacie telesá. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou keramickou dlažbou.

#### ***Vybavenie pracoviska:***

Je vybavená pracovnými laboratórnymi stolmi s úložným priestorom v spodnej časti, nástennými skrinkami, váhovým pracovným stolom, zmrazovacím mikrotómom Leica. V laboratóriu sa budú spracovávať biologické vzorky (tkanivá) na ultratenké rezy.

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

### **Miestnosť č. 1.42. Umyváreň laboratórneho skla**

Miestnosť s obkladom do výšky 1,8 m, bez prirodzeného osvetlenia a vetrania. Umelé osvetlenie zabezpečujú stropné osvetľovacie telesá. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou keramickou dlažbou.

#### ***Vybavenie pracoviska:***

Miestnosť je vybavená pracovným laboratórnym stolom, nerezovým drezom, sušičkou a autoklávom. Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

Miestnosť bude slúžiť na umývanie a sušenie laboratórneho skla.

### **Miestnosť č. 1.43. Fotokomora**

Miestnosť s obkladom do výšky 1,8 m, bez prirodzeného osvetlenia a vetrania. Umelé osvetlenie zabezpečujú stropné osvetľovacie telesá. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou podlahovou krytinou z PVC. Je to miestnosť s prívodom vody.

### ***Vybavenie pracoviska:***

Je vybavená dvoma suchými a jedným mokrým laboratórnym stolom s nerezovým dvojdzrezom, úložným priestorom v spodnej časti a závesnými skrinkami.

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

### **Miestnosť č. 1.46. Fyzikálne laboratórium**

Miestnosť s vybielenými umývateľnými stenami do výšky 1,5 m, presvetlená svetlými, bez prirodzeného vetrania. Umelé osvetlenie zabezpečujú stropné osvetľovacie telesá. Podlaha je pokrytá dobre umývateľnou podlahovou krytinou z PVC.

### ***Vybavenie pracoviska:***

V miestnosti sú umiestnené chladničky, mrazničky, hlbokomraziaci box, centrifúga K-70, scintilačný počítač Beckman.

Miestnosť slúži na uskladnenie vzoriek, roztokov a chemikálií, ktoré vyžadujú nízke teploty.

Pracovisko **nie je miestom** trvalého pracovného výkonu.

### **Miestnosti 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16 – pracovne vedeckých pracovníkov Oddelenia fyziológie a etológie**

Miestnosti majú omietkové steny, podlahu prekrytú kobercom. Otvárateľné okná tienené žalúziami zabezpečujú prirodzené vetranie a osvetlenie, umelé osvetlenie je zabezpečené stropnými osvetľovacími telesami.

Pracovisko je spravidla vybavené: pracovným stolom, kancelárskou stoličkou bez nastaviteľných opierok predlaktia, skriňovou zostavou, PC s LCD monitorom, telefónom a okrem kancelárie 3.16 je v nich aj umývadlo.

Na pracovisku sa vykonáva administratívna práca spojená s prácou so zobrazovacou jednotkou, ktorá predstavuje prevažnú časť pracovnej doby s možnosťou prerušenia práce.

## **2. Nebezpečné chemické faktory používané v laboratóriách**

V zmysle Posudku o riziku pri práci s NCHF, ktorý je neoddeliteľnou súčasťou tohto prevádzkového poriadku, sú pracovné činnosti v našich laboratóriách z hľadiska expozície NCHL zaradené do **kategórie 2**, čo predstavuje únosnú mieru zdravotného rizika.

### **Rozdelenie NCHF**



### **Veľmi toxické látky (H300, H310, H330)**

azid sodný (derm., kat. 1, oral., kat. 2), etidiumbromid (inh., kat. 2), 2-merkaptetoetanol (derm., kat. 2), cykloheximid (oral., kat. 2),

### **Toxické látky (H301, H311, H331)**

acrylamid (oral., kat. 3), apomorfín (kat. 3, H336 cieľový orgán), formaldehyd (kat. 3), fenol (oral., derm., inh., kat. 3), glutaraldehyd (oral., inhal., kat. 3, derm., kat. 1) haloperidol (oral., kat. 3), chloroform (inh., kat.3), kyselina iboténová (oral., kat. 3), metanol (oral., derm., inh., kat. 3), tetraboritan sodný (inhal., kat. 2, dermal.,kat. 1), fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF) (oral., kat. 3), jodacetamid (oral., kat. 3), digitonin (derm., oral., kat. 3), DL-epinephrin (derm., kat. 3),

### **Mutagénne látky (H340, H341)**

fenol (kat.2), formaldehyd (kat.2), 3,3'-diaminobenzidín (DAB) (kat. 2), akrylamid (kat.1B), cykloheximid (kat.2)

### **Karcinogénne látky (H350, H351)**

formaldehyd (kat. 1B), formamid (kat. 2) chloroform (kat. 2), paraformaldehyd (kat. 2), trypan blue (kat.1B), 3,3'-diaminobenzidín (DAB) (kat. 1B), akrylamid (kat. 1B), thiourea (kat. 2),

### **Reprodukčne toxické látky (H360, H361)**

akrylamid (kat. 2), cytozín -β-D- arabinofuranozid (kat. 2), cytozín -β-D- arabinofuranozid (kat.2), haloperidol (kat. 2), kyselina boritá (kat. 1B), formamid (kat. 1B), chloroform (kat. 2), Biotin disulfide N-hydroxysuccinimide ester (kat.1B), spiperón (Kat. 2), cykloheximid (kat. 1B), thiourea (kat. 2)

### **Karcinogény :**

#### **Kategória 1: Známe alebo pravdepodobné ľudské karcinogény**

**Kategória 1A:** látka, o ktorej je známe, že má karcinogénny potenciál pre ľudí a klasifikácia vo veľkej miere vychádza z dôkazov u ľudí.

**Kategória 1B:** látka, o ktorej sa predpokladá, že má karcinogénny potenciál pre ľudí a klasifikácia vo veľkej miere vychádza z dôkazov u zvierat.

#### **Kategória 2: Podozrivé ľudské karcinogény**

### **Mutagény:**

**Kategória 1:** Látky, o ktorých sa vie, že vyvolávajú dedičné mutácie v ľudských zárodočných bunkách.

**Kategória 1A:** Látky, ktoré sa posudzujú tak, ako keby vyvolávali dedičné mutácie v ľudských zárodočných bunkách.

*Kategória 1B:* Klasifikácia vychádza z: pozitívneho výsledku (výsledkov) testov in vivo dedičnej mutagenity zárodočných buniek cicavcov alebo z pozitívneho výsledku (výsledkov) testov in vivo mutagenity somatických buniek cicavcov, v kombinácii s niektorými dôkazmi o tom, že látka má potenciál spôsobovať mutácie zárodočných buniek. Tieto podporné dôkazy je možné odvodiť z testovania mutagenity/genotoxicity zárodočných buniek in vivo alebo preukázaním schopnosti látky alebo jej metabolitu (metabolitov) interagovať s genetickým materiálom zárodočných buniek alebo z pozitívnych výsledkov testov, ktoré preukazujú mutagénne účinky v ľudských zárodočných bunkách, bez dôkazu prenosu na potomstvo; napríklad zvýšenie frekvencie aneuploidie v mužských pohlavných bunkách exponovaných ľudí.

***Kategória 2:*** Látky, ktoré vyvolávajú u ľudí obavy, pretože môžu vyvolať dedičné mutácie v ľudských zárodočných bunkách.

### **Reprodukčne toxické látky:**

***Kategória 1 :*** látka známa ako toxická pre ľudskú reprodukciu alebo látka, u ktorej sa táto toxicita predpokladá.

*Kategória 1A:* látka známa ako toxická pre ľudskú reprodukciu - klasifikácia látky vo veľkej miere vychádza z dôkazov od ľudí.

*Kategória 1B:* látka s predpokladanou toxicitou pre ľudskú reprodukciu - klasifikácia látky vo veľkej miere vychádza z údajov zo štúdií o zvieratách.

***Kategória 2:*** látka podozrivá ako toxická pre ľudskú reprodukciu.

S uvedenými látkami sa pracuje v miestnostiach 1.05-1.10 (laboratóriá a predsiene), 1.34 (mikroskopy), 1.37 (fyzikálne laboratórium, príprava zmrazených rezov), 1.43. (fotokomora) a 1.46 (fyzikálne laboratórium) a farebnou lepiacou páskou je označený vymedzený kontrolovaný priestor (digestor, laboratórny stôl, laminárny box), v ktorom sa fyzicky pracuje s karcinogénnymi a mutagénnymi látkami.

## Zoznam pracovníkov exponovaných karcinogénnymi a mutagénnymi látkami

RNDr. Boris Bilčík, PhD.	vedúci oddelenia
RNDr. Jana Antalíková, PhD.	samostatná vedecká pracovníčka
MUDr. Ivan Čavarga, PhD.	vedecký pracovník
Ing. Ľubica Horovská	odborná pracovníčka
Ing. Jana Jankovičová, PhD.	vedecká pracovníčka
RNDr. Ľubor Košťál, CSc.	zástupca riaditeľa
Mgr. Kristína Lukáčová PhD.	vedecká pracovníčka
Mgr. Mariana Máčajová PhD.	vedecká pracovníčka
Ing. Katarína Michalková, PhD.	vedecká pracovníčka
Mgr. Ľubica Niederová PhD.	samostatná vedecká pracovníčka
Mgr. Eva Pavuková PhD.	vedecká pracovníčka
Mgr. Katarína Pichová, PhD.	vedecká pracovníčka
Ing. Petra Sečová, PhD.	vedecká pracovníčka
Ing. Michal Simon, DrSc.	vedúci vedecký pracovník
Prof. RNDr. Michal Zeman, DrSc.	vedúci vedecký pracovník

### Množstvo používaných CMR, toxických a veľmi toxických látok

Látka/zmes	Koncentrácia	Dávkované objemy	Mesačná spotreba	Ročná spotreba
2-merkaptóetanol	0,1%	ml	2,1 ml	7 ml
3,3'-diaminobenzidín (DAB)	1%	µl	1ml	10ml
azid sodný	0,1%	ml	20 ml	80 ml
bromokryptín	≥98%	mg	2,5mg	30mg
cytozín -β-D-arabinofuranozid	16%	mg	100mg	500mg
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	0,00015%	µl	5ml	40ml
etídiumbromid	0,0001%	µl	24 µl	120 µl
fenol	38%	ml	8 ml	30 ml
formaldehyd	37%	ml	2,2 ml	11 ml
formamid	100%	ml	6,5 ml	32,5 ml
formamid	50%	ml	500ml	1000ml
glutaraldehyd	2%	ml	40 ml	200 ml
haloperidol	0,1%	mg	5mg	50mg
kyselina boritá	0,8%	g	2g	20g
kyselina iboténová	1%	mg	2mg	10mg
metanol	100%	ml	300ml	3l
paraformaldehyd	4%	ml	40ml	400ml
spiperón	0,2mg	mg	10mg	100mg
tetraboritan sodný	0,6%	g	2g	20g
akrylamid	prášková subst. 30% roztok	g ml	10g 10ml	30g 100ml

jodacetamid	prášková subst. (100%) roztok (20%)	mg ml		100mg 20ml
fenylmetylsulfonyl fluorid	3,5% roztok	μl	2μl	0,2ml
sulfo-NHS-SS-biotin	prášková subst.	mg	1mg	2mg
tiomočovina (thiourea)	prášková subst.	mg	0,1mg	1mg
cykloheximid	prášková subst. 1% roztok	mg μl	50 μl	1mg
DAB- 3,3 diaminobenzidín tetrahydrochlorid	prášková substancia	mg	3,75 mg	37,5 mg
digitonín	prášková subst. 1% roztok	mg ml		1ml
DL-epinephrin	prášková subst. zás. roztok 0,2mM	μl	100 μl	1,2ml

Pracovníci si denný čas expozície toxickými, veľmi toxickými, karcinogénnymi, mutagénnymi a reprodukčne toxickými látkami zapisujú do svojho osobného zošita s názvom „Záznam o expozícii zamestnanca NCHL“. Tento zošit podlieha archivácii 40 rokov po skončení práce.

Práce s NCHL vedie odborne spôsobilá osoba s platným osvedčením o odbornej spôsobilosti na prácu s toxickými a veľmi toxickými látkami. Osoby, ktorá vlastní platné osvedčenie o odbornej spôsobilosti na prácu s toxickými a veľmi toxickými látkami a zmesami:

- RNDr. Dana Tahotná, PhD. – číslo osvedčenia: OOD/8223 /2016

### **3. Popis vybraných pracovných činností v laboratóriách, pri ktorých sa používajú vyššie uvedené nebezpečné chemické faktory**

#### **Miestnosť č. 1.05 - Laboratórium aviárnej fyziológie**

Miestnosť v ktorej sa používajú nebezpečné chemické látky pri nasledovných metodikách:

#### ***Príprava 1% iboténovej kyseliny***

Roztok pripravíme zmiešaním 1 mg kyseliny iboténovej v 100  $\mu$ l deionizovanej vody.

#### ***Fixácia tkaniva***

Fixácia mozgového tkaniva sa uskutočňuje transkardiálnou perfúziou fosfátovým tlmivým roztokom (PBS), ktorý je neskôr nahradený 4% roztokom paraformaldehydu. Procedúra sa uskutočňuje v digestore a trvá asi 30 min. Po vypreparovaní sa mozog postfixuje 5h v 4% roztoku paraformaldehydu. Celkové množstvo paraformaldehydu závisí od druhu zvierťa a môže byť od 50ml (zebrička) až po 400 ml (kura). Metodika sa používa asi 5 krát za mesiac.

#### ***Skladovanie rezov tkaniva***

Rezy fixovaného tkaniva sa uchovávajú v PBS s prídavkom 0,1% azidu sodného v chladničke.

Rezy čerstvo zmrazeného mozgu uložené na podložných sklíčkach a určené pre ligandovú väzbu sa uchovávajú v krabiciach spolu so silikagélom pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### ***Príprava AraC***

Roztok pripravíme rozpustením 16mg cytozín  $-\beta$ -D- arabinofuranozidu (AraC) v 100  $\mu$ l deionizovanej vody.

#### ***Fluorescenčné imunohistochemické farbenie***

Na imunofluorescenčnú detekciu proteínov sa používajú kryostatové rezy zmrazeného tkaniva. Po prepláchnutí rezov v PBS nasleduje inkubácia 1h v blokovacom roztoku obsahujúcom PBS, 0,1% boviný sérový albumín a 0,3% Triton X-100. Následne sa preparát inkubuje v príslušnej primárnej protilátke, premyje 3x 5min v PBS a inkubuje vo fluorescenčne značenej sekundárnej protilátke. Rezy na podložných sklíčkach sa pokryjú médiom, ktoré môže obsahovať DAPI a prikryjú krycím sklíčkom. Metodika sa robí podľa potreby v priemere 2 – 3 krát do mesiaca.

#### ***Imunohistochemické farbenie pomocou DAB***

Na detekciu proteínov sa používajú kryostatové rezy zmrazeného tkaniva. Po prepláchnutí rezov v PBS nasleduje inkubácia v 30min v 1%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , prepláchnutie v PBS, inkubácia 1h v blokovacom roztoku obsahujúcom PBS, 0,1% boviný sérový albumín a 0,3% Triton X-100. Následne sa preparát inkubuje v príslušnej primárnej protilátke, premyje 3x 5min v PBS, inkubuje 2h v komplexe avidín-biotín prepláchnie v PBS a farbí 1-10 min v závislosti na

protilátke. Farbiaci roztok 1 kvapku DAB na 5ml. Rezy na podložných sklíčkach sa pokryjú médiom a prikryjú krycím sklíčkom. Metodika sa robí podľa potreby v priemere 2 – 3 krát do mesiaca.

### ***In situ hybridizácia***

Do ependorfovej skúmavky sa pridá 0,1 µl DEPC vody, 1,5 µl DNA, 1 µl transkripčného roztoku, 0,5 µl DTT, 0,5 µl inhibítora RNAz, 0,5 µl AGC mixu, 3 µl S<sup>35</sup> UTP a 1 µl RNA polymerázy. Roztok sa nechá inkubovať 3h v 37 °C vodnom kúpeli. Potom sa pridá 40 µl DEPC vody, 5 µl acetátu sodného a 125 µl 100% etanolu a inkubuje sa 15 min v suchom ľade. Po centrifugácii sa supernatant odsaje a peleta rozpustí v 200 µl 70% etanolu. Po centrifugácii sa supernatant znova odsaje, k pelete hotovej RNA próby sa pridá 10 µl DEPC vody a hybridizačný roztok.

Rezy tkaniva uložené na podložných sklíčkach sa fixujú 5 min v 3% paraformaldehyde, opláchnu v PBS a acetyľujú v acetylačnom roztoku (13,6 ml trietanolamínu a 2,52 ml anhydridu kyseliny octovej v 1 l deionizovanej vody). Po prepláchnutí v SSPE tlmivom roztoku sa dehydratujú po 2 min v 70%, 95% a 100% etanole. Po vyschnutí sa na rezy nanesie hybridizačný roztok s RNA próbou, pokryje sa krycím sklíčkom a nechá inkubovať pri 65 °C v olejovom kúpeli 8-16h podľa typu próby. Potom sa olej odstráni v roztoku xylénu. Rezy na podložných sklíčkach sa inkubujú 1h v roztoku SSPE s prídavkom 0,1 % merkptoetanolu pri laboratórnej teplote, potom v SSPE s 50% formamidom a 0,1% merkptoetanolom 1h v inkubátore pri 65 °C, v SSPE 2x30min pri 65 °C a dehydratujú po 2 min v 70%, 95% a 100% etanole.

### ***Silanizovanie podložných sklíčok***

Podložné sklíčka sa namočia na 20 min do 1M HCl, opláchnu 3x v deionizovanej vode, odvodnia 20 min v 99% etanole a vysušia. Potom sa ponoria na 10s do 2% roztoku 3-aminopropyltriethoxysilane v suchom acetóne. Opláchnu sa 2x v suchom acetóne, 1x v deionizovanej vode a nechajú sa uschnúť. Procedúra sa vykonáva v digestore asi 3x za rok.

### ***Príprava DEPC vody***

V digestore sa do 100 ml deionizovanej vody sa pridá 0,1ml DEPC a nechá stáť cez noc alebo 12h. Potom sa roztok autoklávuje. Roztok sa pripravuje 8x za rok.

### ***Príprava hybridizačného roztoku***

Do skúmavky nalejeme 5 ml formamidu a pridáme 600 µl NaCl, 100 µl Tris-HCl, 240 µl EDTA, 100 µl DTT, 250 µl tRNA, 1 g dextran sulfátu a doplníme DEPC vodou na 10 ml. Ročne pripravujeme asi 50 ml.

### ***Nisslovo farbenie***

Tkanivové rezy na podložných sklíčkach sa ponoria na 2 min do xylénu, zavodnia sa po 2 min v 100%, 95% a 70% etanole a 2 min vo vode. Potom sa farbja 10 min v 0,3% roztoku krezylovej violete, prepláchnu vo vode a postupne vysušia prepláchnutím v 50%, 70%, 95%,

95%, 100% a 100% etanoloch. Ponoria sa 2 razy na 2min sa do xylénu a zakryjú krycím sklíčkom pomocou zalievacieho média solakryl. Metodika sa vykonáva v digestore asi 3x za rok.

### ***Ligandová väzba***

Na tkanivové rezy na podložných sklíčkach sa pridá 100 µl tríciovaneho ligandu (napr. 1 nM [<sup>3</sup>H] SCH 23390 alebo [<sup>3</sup>H] spiperón). Nešpecifická väzba je určovaná pomocou rovnakého roztoku s prídavkom nadbytku neznačeného ligandu (napr. 1 µM SCH 23390, SKF 38393, butaklamol, haloperidol, spiperón, apomorfín, sulpirid, quinpirol). Rezy sú potom ponorené 2 razy na 5 min v chladenom Tris-HCl tlmivom roztoku a opláchnuté v deionizovanej vode. Rezy sú potom zotreté zo sklíčok filtračnými papierikmi a uložené do scintilačných fľašiek. Po pridaní 7 ml scintilačného roztoku SLS-41 a trepaní 2h je zmeraná rádioaktivita naviazaná v tkanive pomocou scintilačného počítča. Metodika je používaná 1 krát za rok.

### ***Extrakcia nukleových kyselín***

Fenol sa používa ako súčasť chemikálie Trizol pre extrakciu nukleových kyselín, spolu s chloroformom. Celková expozícia je 10 ml denne po 7 minút, 10 krát ročne. V digestore sa robí elektroforetické delenie vyzolovanej RNA vo formaldehydovom géli (2,2 ml 37% formaldehydu), s použitím formamidu (6,5 ml 100% formamidu). Na vizualizáciu RNA sa používa EtBr (etídiumbromid) 1,5 µl (1mg/ml). Gél s EtBr sa likviduje ako nebezpečný odpad. Metodika zahŕňa prácu s nebezpečnými chemickými faktormi, preto vyžaduje striktné dodržiavanie bezpečnostných opatrení a používanie osobných ochranných pomôcok a digestora. Metodika sa robí 5 krát ročne.

### ***Fixácia vzoriek chorioalantoickej membrány na meranie fraktálneho koeficientu***

Biologický materiál sa fixuje 2 dni v digestore vo fixačnom roztoku (4% paraformaldehyd, 2% glutaraldehyd), maximálne v 60 ml. Metodika sa robí 5-krát do roka.

### ***Príprava vzoriek pre parafínové rezy***

Chorioalantoickú membránu uskladňujeme minimálne 24 hodín v 4% paraformaldehyde, predfarbujeme eozínom, preplachujeme v rade etylalkoholov (3 x 96%, 100%) a xylénu. Membrány prenesieme do pripravených misiek s roztopeným parafínom (59°C) a necháme v inkubátore 24 hodín. Vzorky zalejeme paraplastom.

### ***Hematoxylín – eozín farbenie zmrazených rezov CAM***

Rezy na podložných sklíčkach fixujeme 5 minút v 4 % formaldehydovom roztoku. Po fixácii rezy vložíme do roztoku PBS, potom do hematoxylínu. Prepláchneme v destilovanej vode, roztoku amoniaku, v tečúcej vode, v 80% etylalkohole a vložíme do eozínu. Po farbení vložíme do 95% a 100% etylalkoholu. Vzorky zakrývame krycím sklíčkom s použitím montovacieho média. Metodika sa robí 10-krát do roka.



### ***Hematoxylín – eozín farbenie parafínových rezov CAM***

Rezy na podložných sklíčkach zbavujeme parafínu pomocou xylénu a etylalkoholu (96%, 70%), prepláchneme vodou, vložíme do hematoxylínu, prepláchneme vodou, etylalkoholom (70%, 96%), vložíme do eozínu, prepláchneme 96% a 100% etylalkoholom. Vzorky zakrývame krycím sklíčkom s použitím montovacieho média. Metodika sa robí 15-krát do roka.

### ***Príprava roztokov na pokusy s hydinou ovplyvňujúcich dopamínové receptory***

Aktívne látky ovplyvňujúce dopamínové receptory sú podľa počtu a hmotnosti zvierat prepočítané a rozpustené v PBS (1ml/kg živej hmotnosti zvierat). Používaná koncentrácia pre haloperidol je 0,5mg/kg živej hmotnosti zvierat (t.j. 0,5mg haloperidolu sa rozpustí v 25 $\mu$ l kyseliny octovej a 950 $\mu$ l PBS) a pre bromokryptín je 1mg/kg živej hmotnosti zvierat (t.j. 1mg bromokryptínu sa rozpustí v 1ml PBS). Ročne sa pripravuje približne 30ml z každého roztoku.

### **Miestnosť č. 1.07 - Sterilný box pre prácu s aviárnymi embryami a bunkovými kultúrami**

Je to miestnosť vyhradená na kultiváciu embryí prepelice japonskej (*Coturnix japonica*) a na fotodynamickú diagnostiku – terapiu. Oplodnené vajíčka sú na tretí embryonálny deň v sterilnom laminárnom boxe otvorené a embryá prenesené do kultivačných platničiek a ďalej inkubované v inkubátore. Na siedmy deň embryonálneho vývinu sú embryá použité na lokálnu aplikáciu rôznych liečiv, následne sú fixované 4 % formaldehydovým roztokom. Metodika sa robí 8-krát do roka.

V tejto miestnosti je na chorioalantoickú membránu (CAM) prepelice japonskej aplikovaná fotodynamicky aktívna látka – hypericín, následne ožiarená diódovým laserom (Ocean optics, USA) s vlnovou dĺžkou 405 nm , dávkou svetla 16,8 J/cm<sup>2</sup>; a intenzitou svetla 140 mW/cm<sup>2</sup>.

### **Miestnosť č. 1.09 Sterilný box pre kultiváciu bunkových kultúr**

#### ***Partenogenetická aktivácia oocytov***

Na indukciu partenogenézy sa využíva cykloheximid, (zásobný roztok 1mg/ml, riedený 1:100),

2,5 h v CO<sub>2</sub> termostate. K expozícii dochádza po dobu maximálne 5 minút počas prípravy kultivačných dosiek, 5-10x ročne.

#### ***In vitro fertilizácia***

Počas kultivácie gamét v CO<sub>2</sub> termostate sa pridáva DL- epinephrin, na podporu bunkového štiepenia. K expozícii dochádza po dobu maximálne 1 minútu počas prípravy kultivačných dosiek, 1x týždenne.

### **Miestnosť č. 1.10. Laboratórium**

### **Imunofluorescenčná analýza**

Na imunofluorescenčnú analýzu sa používajú nátery suspenzie buniek alebo kryostatové rezy zmrazeného tkaniva, ktoré sa fixujú v metanole 30 sekúnd alebo v roztoku acetón - metanol (50% metanol) 5 minút pri laboratórnej teplote. Nasleduje premytie v PBS a inkubácia v blokovacím roztoku. Následne sa preparát inkubuje v primárnej protilátke a po premytí v PBS v sekundárnej protilátke. Preparáty sa pokryjú médiom, ktoré môže obsahovať DAPI a prikryjú krycím sklíčkom. Pri fixácii je potrebné dodržiavať príslušné bezpečnostné opatrenia. Styk s nebezpečným chemickým faktorom ( metanol ) počas fixácie je krátkodobý. Metodika sa robí podľa potreby v priemere 2-krát do týždňa.

### **Polyakrylamidová gélová elektroforéza ( PAGE ) a Western blot analýza**

Princípom elektroforézy je delenie proteínov v elektrickom poli podľa veľkosti náboja, molekulovej hmotnosti a tvaru. Ako nosič sa využíva polyakrylamidový gél, ktorý si pripravujeme z akrylamidového monoméru a sieťovacieho monoméru N,N-metylén-bis-akrylamidu (zásobný roztok má koncentráciu 30%). Na začatie polymerizačnej reakcie pridáme TEMED (N,N,N,N-tetrametyléndiamín) a persíran amónny. Vzorku proteínov nanášame vo vzorkovom tlmivom roztoku, ktorý obsahuje dodecylsulfát sodný (SDS), 2-merkaptóetanol a brómfenolovú modrú (farbička). Celý proces elektroforetickej separácie prebieha v aparátúre, ktorá je ponorená v tlmivom roztoku obsahujúcom Tris, glycín a SDS. Po rozdelení v géli sú proteíny prenesené metódou polosuchého alebo „mokrého“ blotu na PVDF (aktivácia metanolom) alebo nitrocelulózu membránu. Prenos proteínov z gélu na membránu prebieha medzi plošnými elektródami s pruhmi papierov nasiaknutými blotovacím roztokom (obsahuje metanol). Po skončení procesu je membrána inkubovaná s primárnou, a potom so sekundárnou protilátkou. Na detekciu proteínov je využívaná chemiluminiscenčná ECL metóda, metóda farbenia striebrom alebo vizualizácia cez komerčne dodávané substráty BCIP/NBT alebo TMB.

Príprava vzoriek a akrylamidového gélu na elektroforézu zahŕňa prácu s nebezpečnými faktormi (akrylamid, 2-merkaptóetanol, - fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF), digitonín), preto vyžaduje striktné dodržiavanie bezpečnostných opatrení a používanie osobných ochranných pomôcok. K expozícii dochádza po dobu maximálne 5 minút počas prípravy vzoriek a nalievania gélu. Metodika sa robí priebežne, približne 1 až 2-krát za týždeň.

Blotovanie vyžaduje prácu s tlmivým roztokom obsahujúcim 20% metanol, preto je dôležité dodržiavanie bezpečnostných opatrení a používanie osobných ochranných pomôcok. Doba expozície je max. 10 minút (100ml 20% metanolu) počas prípravy tlmivého roztoku, aktivácie membrány, zostavovania aparátúry, vyberania a oplachovania gélu a membrány.

### **2D elektroforéza**

Prvým krokom metodiky je izoelektrická fokusácia (IEF) – prvý rozmer. Princípom je rozdelenie proteínov v géli s imobilizovaným pH gradientom. Po aplikácii napätia putujú proteíny do miesta svojho izoelektrického bodu, v ktorom sú sústredené. Pri IEF sa využívajú

komerčne dodávané gélové stripy s požadovaným pH gradientom. Tieto sú rehydratované v tlmivom roztoku (v niektorých prípadoch s obsahom tiomočoviny (thiourea)), s obsahom vzorky proteínov, vložia sa do aparatury, v ktorej proces delenia prebehne. Stripy po vybratí z aparatury sú omyté v tlmivom roztoku, v niektorých prípadoch môžu byť omyté v tlmivom roztoku s obsahom jódacetamidu (krátka expozícia 10 min, 4-5 x ročne).

Druhým krokom je SDS PAGE – druhý rozmer, v ktorej sa ako vzorka použije celý strip s rozdelenými proteínmi. Nasleduje western blot analýza a detekcia cez protilátky (vyššie spomínaný postup).

Doba expozície NCHF ( jódacetamid ) je krátkodobá.

#### ***Biotinylácia povrchových proteínov buniek***

Na značenie povrchových proteínov sa využíva Sulfo-NHS-SS-Biotin, s ktorým sa bunky inkubujú 30 min. v uzavretej skúmavke, po zastavení reakcie, premytí, centrifugácii a lýze sa zmrazia na ďalšie spracovanie. Doba expozície NCHF (Sulfo-NHS-SS-Biotin) je krátkodobá (5-10min), 1-2x ročne.

## **4. Pravidlá pre prácu s chemickými faktormi v laboratóriách**

Prácu s toxickými a veľmi toxickými látkami a zmesami môže viesť len osoba, ktorá vlastní platné osvedčenie o odbornej spôsobilosti na túto činnosť:

- RNDr. Dana Tahotná, CSc. – číslo osvedčenia: OOD/ 8223 /2016

S chemickými faktormi môže pracovať len osoba, ktorá bola riadne a preukázateľne oboznámená na prácu s týmito látkami.

Pred vstupom do laboratórií je nutné obliecť si pracovný plášť a obuť pracovnú obuv.

Pri práci treba používať ochranné pracovné prostriedky (ochranné rukavice, pracovný odev a respirátor, prípadne ochranné okuliare alebo štít na celú tvár).

Pracovný priestor na prácu s nebezpečnými chemickými faktormi musí byť zreteľne vyznačený.

Pri práci s prchavými toxickými látkami sa používa certifikovaný chemický digestor (miestnosť 1.05).

Pracovné miesto musí byť udržiavané v poriadku a čistote.

Pracovné oblečenie a osobné veci musia byť uložené oddelene.

Je zakázané pipetovať ústami.

V laboratóriách sa nesmie jesť, piť, fajčiť.

Počas pracovnej doby je zakázané požívať alkoholické nápoje, omamné a psychotropné látky a pod ich vplyvom nastupovať do zamestnania.

Do miestnosti, kde sa pracuje s chemickými látkami môže vstupovať iná osoba len v sprievode zodpovednej osoby z laboratória.

## **5. Uchovávanie chemických faktorov**

Všetky chemické látky a zmesi ktoré sa nachádzajú v sklade chemikálií a v laboratóriách, sú skladované v zmysle platnej legislatívy. Znamená to, že toxické a veľmi toxické látky sú uskladnené samostatne (aby nedochádzalo vzájomnému pôsobeniu látok) v uzamykateľnej skrinke. Spotreba a prísun toxických a veľmi toxických látok sa kontroluje a písomne eviduje do zošitov evidencie prísunu a odberu týchto látok. Zodpovednosť za prísun a odber NCHL má osoba s odbornou spôsobilosťou na prácu s toxickými a veľmi toxickými látkami.

Horľaviny sú uložené v uzamknutej plechovej skrini, žieraviny sú v polypropylénovej uzamknutej skrini a metanol ako horľavá a zároveň toxická látka je uskladnený v samostatnej uzamknutej plechovej skrini.

Chemické látky využívané na denné použitie sú uložené v skrinkách v laboratóriách, alebo v mraziacom boxe a v chladničkách.

Na uchovávanie nebezpečných chemických faktorov v zmysle vyššie uvedených pravidiel slúžia miestnosti č. 1.05, 1.09, 1.10, 1.35, 1.46.

## **6. Označovanie chemických faktorov**

Takmer všetky chemické látky a zmesi v laboratóriách sa nachádzajú v originálnych obaloch od výrobcov a teda spĺňajú požiadavky kladené na označovanie chemických látok a zmesí. Tie chemické látky, ktoré nie sú v originálnych obaloch alebo sú to pripravené roztoky, príp. sú to staré chemikálie, ktorých značenie nevyhovuje súčasným legislatívnym požiadavkám, sú označené štítkom, na ktorom sú všetky údaje potrebné na spoľahlivú identifikáciu (názov látky alebo roztoku, koncentrácia, dodávateľ, mol. hmotnosť, výstražný symbol, dátum prípravy,...) aby sa zamedzilo ich zámene.

## **7. Likvidácia chemických faktorov**

V uvedených laboratóriách sa vo väčšine prípadov manipuluje s nebezpečnými chemickými látkami v kvapalnej podobe s veľmi nízkou koncentráciou nebezpečnej chemickej látky (mg/ml, µg/ml,..) a používané množstvá na manipuláciu sa pohybujú v µl, resp. ml objemoch. Nespotrebované objemy nebezpečných chemických látok sa obvykle zmrazujú a používajú sa pri ďalších pokusoch. Je to z dôvodu minimalizácie množstva nebezpečných odpadov. Prebytočné roztoky kyselín a hydroxidov sa po obrovskom zriedení vylievajú do kanalizácie. V prípade výskytu prebytočných roztokov s obsahom toxických a veľmi toxických látok sa tieto zhromažďujú v sklenených označených fľašiach, pracovné pomôcky, ktoré prišli do styku s

nebezpečnými chemickými látkami (pipetové špičky, rukavice, plastové nádoby) sa zhromažďujú v označených plastových vreciach a sú zneškodňované v zmysle zmluvy **DETOX s. r. o. Zvolenská cesta 139, 974 05 Banská Bystrica číslo zmluvy: ZDS-2017-22-000036.**

## **8. Udalosť, nehoda a porušenie pravidiel**

### **Udalosť**

Každá udalosť, ktorá by mohla spôsobiť alebo už spôsobila nekontrolovaný únik nebezpečnej chemickej látky, musí byť individuálne posúdená z hľadiska jej dôsledku a v prípade závažného zistenia aj zaevidovaná.

#### **Príklad:**

- rozliatie roztoku nebezpečnej chemickej látky alebo rozsypanie práškovej nebezpečnej chemickej látky do pracovného priestoru, na podlahu, na odev, resp. nechránené časti tela.

#### **Postup v prípade udalosti:**

- prerušiť prácu, kontaktovať vedúceho projektu a zreteľne opísať danú udalosť
- pokúsiť sa zabrániť ďalšiemu šíreniu nebezpečnej chemickej látky do okolia a pokračovať v zmysle havarijného plánu
- zaznamenať všetky zlyhania počas práce a analyzovať udalosť

### **Nehoda**

Nehoda zahŕňa všetky udalosti, pri ktorých počas manipulácie s nebezpečnými chemickými látkami došlo k zraneniu zamestnancov. Každá nehoda musí byť zaznamenaná.

#### **Postup pri nehode:**

- okamžite nehodu ohlásiť priamemu nadriadenému alebo vedúcemu projektu
- v prípade poranenia (porezanie, pichnutie) nechať ranu krváčať tak dlho, ako je to možné, potom opláchnuť po tečúcou vodou a následne opláchnuť 70 % alkoholom alebo jódomovou tinktúrou
- v prípade, že došlo k požitiu toxickkej, príp. veľmi toxickkej chemickej látky, treba postupovať podľa nasledovných pravidiel:
  - prerušiť pôsobenie jedu a zabrániť jeho ďalšiemu vstrebávaniu
  - jed eliminovať z organizmu
  - jed neutralizovať podaním protijedu

- udržiavať životne dôležité funkcie (dýchanie, krvný obeh) a zabezpečiť lekársku pomoc alebo odvoz do nemocnice

Zabránenie ďalšiemu vstrebávaníu jedu

- podľa mechanizmu jeho účinku a brány vstupu do organizmu.

### **Inhalačné otravy**

Pri otravách plynmi a výparmi treba postihnutého čo najskôr vyniesť zo zamoreného prostredia a uvoľniť mu šatstvo. Väčšina inhalovaných plynov a pár sa z organizmu odstráni vydýchaním (exhaláciou). Preto je dôležité dbať na dobrú funkciu dýchania postihnutého.

### **Otravy vstrebaním cez kožu**

Najdôležitejším úkonom je vyzliecť odev poliaty jedom, resp. žieravinou, dôkladné omytie poliatej časti tela prúdom tečúcej vody, pri poliatí fenolom a benzénom umytie mydlom a následne vodou. Mydlo nepoužijeme vtedy, ak sú na koži pokročilé patologické zmeny. V týchto prípadoch postupujeme ako pri popáleninách a taktiež sa usilujeme predísť šoku postihnutého.

### **Perorálne otravy**

Pri perorálnych otravách treba čo najskôr z tráviaceho traktu odstrániť zvyšky nevstrebaneho jedu vyvolaním zvracania, výplachom žalúdka a prehľadkami. Ak postihnutý spontánne zvracia a má hnačku, neusilujeme sa ich tmiť, ale ak to zdravotný stav postihnutého umožňuje, podporujeme ich. Súčasne však treba predchádzať odvodneniu organizmu prísunom dostatočného množstva tekutín.

**Zvracanie.** Vyvolá sa, prípadne podporí, pitím vlažnej slanej vody pripravenej rozpustením čajovej lyžičky kuchynskej soli v pohári vody. Zvracanie sa nevyvoláva, ak postihnutý je v bezvedomí, v kŕčoch a po požití žieravín, aby nedošlo k prederaveniu naleptaného pažeráka.

**Výplach žalúdka.** Žalúdok sa vyplachuje vlažnou vodou alebo fyziologickým roztokom, ktorý si pripravíme rozpustením čajovej lyžičky soli v litri vody. Pri otravách organickými rozpúšťadlami a látkami rozpustnými v tukoch sa robia výplachy 150-300 ml parafínového oleja.

### **Neutralizácia jedu podaním protijedu**

Ak sa nepodarilo zabrániť vstrebaniu jedu do organizmu, usilujeme sa neutralizovať jed podaním protijedu. Univerzálnym protijedom v bežných laboratórnych podmienkach je živočíšne uhlie.

### **Udržiavanie životne dôležitých funkcií**

Pri ťažkých otravách, kedy môže dôjsť k bezvedomiu a zastaveniu dýchania, príp. krvného obehu je nevyhnutné okamžite začať s oživovaním podľa postupu:

- a) vyčistiť ústnu dutinu
- b) uložiť postihnutého naznak na tvrdú a rovnú podložku
- c) zakloniť hlavu
- d) upchať nos
- e) vykonať 2 umelé vdychy z pľúc do pľúc
- f) vykonať 15 stlačení hrudníka o cca 5 cm
- g) pokračovať v oživovaní v pomere 2 vdychy : 15 stlačení hrudníka; hrudník stláčať asi jedenkrát za sekundu až do obnovenia spontánnej srdcovej a dychovej aktivity alebo do príchodu lekárskej prvej pomoci

### **Opatrenia pri šoku**

Pri šoku pôsobí postihnutý nepokojným dojmom, je mu nevoľno, je bledý, má studenú a spotenú kožu, slabý pulz a zrýchlené dýchanie.

Postupuje sa nasledovne:

- a) postihnutého pohodlne uložiť, zaistiť pokoj, aktívne upokojovať
- b) zabrániť podchladeniu prikrytím dekou alebo plášťom
- c) zdvihnúť dolné končatiny o cca 30 cm (autotransfúzna, protišoková poloha)
- d) privolať lekársku pomoc
- e) kontrolovať vedomie, dýchanie a pulz

**Prevoz do nemocnice** sa zabezpečuje aj pri otravách s ľahším priebehom, kedy sa zdá, že ich postihnutý prekonal

- a) v prípade nehody s kyselinou – ak kyselina pôsobí na pokožku, odstráni sa odev a postihnuté miesto sa omyje prúdom tečúcej vody. Pri poleptaní očí, kedy je bolesť sprevádzaná kŕčom očného svalstva, je nevyhnutné prstom odtiahnuť viečko a oplachovať oko prúdom vody smerom od nosa, aby voda nevtekala do druhého oka. Pri požití koncentrovaných kyselín sa nevyvoláva vracanie kvôli nebezpečenstvu perforácie pažeráka a žalúdka, ale obsah žalúdka sa zriedi vypitím čistej vody. Na neutralizáciu sa podáva 3% roztok hydrogénuhličitanu sodného (sóda bikarbóna, lekárska sóda). V prípade, že boli zasiahnuté oči a ústa, opláchnuť ich veľkým množstvom vody.
- b) prvá pomoc pri nehode s hydroxidmi je v podstate rovnaká ako u kyselín s tým rozdielom, že na neutralizáciu sa podáva zriedený roztok octu alebo 3% kyselina citrónová. Pri poleptaní povrchu tela väčšieho rozsahu sa rany po opatrnom omytí vodou prekryjú sterilným obvazom a postihnutý sa odvezie k lekárovi.
- c) vyhľadať lekársku pomoc

d) nehodu písomne zaznamenať

### **Porušenie pracovných pravidiel**

Akákoľvek iná manipulácia s nebezpečnými chemickými faktormi, ktorá nie je popísaná v tomto Prevádzkovom poriadku sa môže považovať za porušenie pracovných pravidiel a musí byť zaznamenaná

## **9. Postup v prípade kontaminácie priestoru rizikovým faktorom**

- Všetky činnosti vykonávať v rukaviciach!
- Ak je to možné, odstrániť všetky prekážky z kontaminovanej oblasti.
- Rozliaty roztok chemickej látky podľa jej povahy treba neutralizovať alebo odsáť savým materiálom, ktorý potom treba uložiť do odpadovej nádoby na to určenej.
- Miesto dôkladne umyť vodou.
- Prístroje a iné laboratórne pomôcky kontaminované rozliatym roztokom umyť dostatočným množstvom vody, prípadne sterilizovať v autokláve (sklenený a kovový materiál).
- Pri rozsypaní chemickej látky ju treba opatrne zozbierať tak, aby sa nezvírila do vzduchu. Uložiť do nádoby na to určenej. Podľa povahy chemickej látky treba použiť rúško na tvár, ochranné okuliare a ochranné rukavice. Miesto dôkladne umyť vodou a zabezpečiť dostatočné vyvetranie miestnosti.
- Po skončení prác si treba umyť ruky vodou a mydlom a použiť ochranný krém.

## **10. Ochranné a preventívne opatrenia**

### **lekárske prehliadky:**

- pri nástupe do zamestnania (vstupná lekárska prehliadka)
- pravidelná 1x2 roky, zameraná na psychickú a fyzickú spôsobilosť na prácu s NCHF (výsledky sú uložené na sekretariáte riaditeľa ústavu)

### **technické opatrenia:**

- v laboratóriách sú umiestnené funkčné chemické digestory
- prehodnocovať použitie NCHF v jednotlivých pracovných postupoch a nahrádzať ich neškodlivými pre zdravie zamestnanca
- rizikové pracoviská sú farebne vyznačované páskou
- v prípade potreby merať koncentrácie NCHL v pracovnom priestore zamestnanca



- v prípade potreby merať odťah chemického digestora

**organizačné opatrenia:**

- do laboratórií majú prístup len povolání zamestnanci
- návštevníci len v sprievode povolanej osoby
- prevádzkové predpisy sú umiestnené na dobre viditeľnom mieste
- k dispozícii je lekárnička prvej pomoci
- zamestnávateľ na vlastné náklady prideluje OOPP na základe posúdenia rizika

**povinnosti zamestnancov:**

- pracovať s NCHF len po dobu nevyhnutnú na vykonanie práce
- dodržiavať pokyny a príkazy svojho nadriadeného
- na pracovisku dodržiavať poriadok, čistotu a všeobecné hygienické zásady
- po prerušení práce s NCHF alebo po skončení práce s nimi si umyť ruky
- po skončení práce vypnúť všetky elektrospotrebiče
- zisťovať možné riziká na pracovisku a po ich zistení informovať svojho nadriadeného
- zúčastňovať sa na školeniach BOZP
- v prípade nehody urobiť všetky opatrenia na jej odstránenie
- oboznámiť sa a dodržiavať prevádzkový poriadok
- používať vhodné osobné ochranné prostriedky

**v laboratóriách je zakázané:**

- jesť, piť, fajčiť
- používať akékoľvek zápalné zdroje
- používať elektrické zariadenia bez oprávnenia a povolenia
- vykonávať práce, na ktoré nemajú zamestnanci odbornú spôsobilosť

**vhodné osobné ochranné pracovné prostriedky:**

Profesia	laborant, diplomant, doktorand, odborný pracovník, vedecký pracovník
Ochrana dýchacieho ústrojenstva kolektívna	digestor, prirodzené vetranie
Ochrana dýchacieho ústrojenstva osobná	rúško, dýchacia maska
Ochrana rúk	rukavice EN 374 – 1, 2, 3
Ochrana očí, tváre	štít, ochranné okuliare EN 166
Ochrana celého tela	pracovný odev (nohavice, tričko, košeľa, plášť) a obuv

**ďalšie opatrenia:**

- periodické školenia zamestnancov **1x ročne** (odborne spôsobilou osobou CHF, BF)
- všeobecná bezpečnosť, legislatíva **1x za 2 roky** (technik BOZP)
- prehodnotenie rizika pri každej významnej zmene