

Veiligheidsmaatregelen bij het werken met cel- en weefselkweken

Inleiding

Aan het werken met gekweekte cellen, afkomstig van mens en dier zijn bepaalde risico's verbonden:

1. Het uitgangsmateriaal, bloed of weefsel van mens of dier, kan besmet zijn met pathogene micro-organismen.
2. De gekweekte cellen zijn soms van tumoren afkomstig of kunnen, ook als ze uit normaal weefsel afkomstig zijn, in vitro tot tumorcellen transformeren. Bij prikaccidenten zouden tumorcellen in het bloed of de weefsels van de laboratoriummedewerker terecht kunnen komen
3. De kweek kan tijdens de laboratoriumhandelingen besmet raken met micro-organismen uit biologische materialen zoals serum en trypsine-oplossingen of uit de omgeving, met name van huid of slijmvliezen van de onderzoeker.
4. Celkweken worden vaak gebruikt als substraat voor het kweken van micro-organismen, meestal virussen.

Eenmaal in de kweek beland kunnen veel micro-organismen zich vermenigvuldigen, ofwel in het rijke kweekmedium ofwel in de cellen.

1. Uitgangsmateriaal

Om het risico van de aanwezigheid van pathogene organismen in het uitgangsmateriaal te beoordelen is het belangrijk de bron nader te bezien. Wanneer het weefsel bijvoorbeeld afkomstig is van een SPF proefdierkolonie die regelmatig microbiologisch wordt onderzocht is het risico gering. Bedenk hierbij dat de virologische screening beperkt is tot een reeks bekende virussen; retrovirussen blijven bijvoorbeeld vaak onontdekt. Wanneer het weefsel afkomstig is van niet gescreende dieren, dieren uit het wild of van mensen, zijn de risico's groter. Denk bijvoorbeeld aan het apenvirus Herpes B, dat latent bij makaken aanwezig kan zijn en de historische gebeurtenissen rond Marburg virus en Reston virus. Bij menselijk materiaal is het van belang de kans in te schatten dat de donor een infectie doormaakt of drager is van een of meer virussen. Bloeddonoren zijn grondig gescreend, dus als bron het veiligst.

2. Tumoren

In de vele jaren dat er nu met snel groeiende tumorcellen zoals HeLa is gewerkt is er eigenlijk nooit een schadelijk effect gemeld voor de laboratoriumwerkers. Toch is enige voorzichtigheid geboden. Zo worden virale vaccins nooit bereid met deze cellen als substraat, uit vrees dat er oncogene materiaal in het vaccin terecht zou kunnen komen. Algemeen is de aanbeveling om niet zelf donor te zijn als u cellen gaat transformeren met behulp van Epstein Barr Virus of andere virussen. Hiermee kunt u voorkomen dat u tumorcellen vervaardigt die na accidentele transplantatie door een prikaccident niet worden afgestoten.

3. Laboratoriumbesmetting

Tijdens de celkweekhandelingen kunnen gemakkelijk micro-organismen in de kweek terechtkomen. Trypsine dat meestal gebruikt wordt voor dissociatie van weefsels en ook het serum in het kweekmedium zijn biologische producten die, afhankelijk van de bron, virussen kunnen bevatten van varkens en runderen. Er is wel serum te koop dat grondig is gescreend, maar dat is dan ook veel duurder. Ook het land van herkomst is van belang: welke dierziekten of latente infecties komen daar voor? Voor trypsine zijn er sinds kort veilige alternatieven in de handel, niet vervaardigd uit dierlijk materiaal maar uit micro-organismen met behulp van genetische modificatie. Ook Mycoplasma infecties kunnen via de reagentia in de celkweek terechtkomen.

Andere bronnen van contaminatie zijn de omgeving en de onderzoeker zelf. Iedere onderzoeker weet uit eigen ervaring dat celkweken gemakkelijk besmet kunnen raken met micro-organismen uit de omgeving, door onsteriele materialen of door een niet perfecte techniek. Ook het waterbad is een bekende bron van infecties.

Tenslotte is er de medewerker zelf, die ook als gezond persoon vele micro-organismen bij zich draagt en bovendien acute of latente infecties doormaakt met bacteriën, mycoplasma's, schimmels, gisten en virussen. Bij niet perfecte techniek kunnen die in de celkweken terechtkomen en zich tot grote aantallen vermenigvuldigen. Bij een infectie met sommige bacteriën, schimmels en gisten ontstaat troebeling van het kweekmedium en is de infectie overduidelijk aanwezig, maar dit is niet altijd het geval. Andere bacteriën, mycoplasma en virale infecties veroorzaken geen troebeling en zelfs niet altijd microscopisch zichtbare veranderingen van de kweek.

Mycoplasma infecties zijn een ware plaag voor de celkweker. De infectie kan zowel uit biologische materialen in de kweekmedia als door onvolkomenheden in de toegepaste "steriele" technieken vanuit de slijmvliezen van de laboratoriummedewerker in de celkweek terechtkomen. Celkweekmateriaal, verkregen van collega's, is toch wel de belangrijkste bron van Mycoplasma infecties. Meestal zijn het soorten die voor de mens niet of zwak pathogeen zijn, maar ze kunnen in de kweek hoge concentraties bereiken en op allerlei manier de resultaten van experimenten vertroebelen. Daarom is het van groot belang regelmatig, bijvoorbeeld elke twee maanden de celkweken te screenen op hun aanwezigheid. Voor dit doel kunnen verschillende typen testen worden gebruikt. Naast de klassieke kweekmethoden met bouillon en agarplaatjes kunnen DNA-kleurstoffen worden gebruikt om mycoplasma's zichtbaar te maken onder een fluorescentiemicroscopie en ook zijn er testen op basis van de PCR. Deze verschillende typen testen hebben ieder hun eigen voor- en nadelen en ze vullen elkaar aan, qua gevoeligheid. Celkweken die afkomstig zijn uit andere laboratoria kunnen het best in quarantaine worden gehouden totdat is vastgesteld dat ze vrij zijn van Mycoplasma.

4. Virologisch werk.

Bij diagnostische werkzaamheden, waarbij celkweken worden beënt met patiëntenmateriaal is meestal niet tevoren bekend om welke virussen of andere micro-organismen, zoals Chlamydiae of Rickettsiae het gaat. In andere gevallen is dit wel bekend als men bewust met een micro-organisme aan het werk gaat. Zolang niet bekend is met welke ziekteverwekker men te maken heeft wordt werken onder **beheersingsniveau 2** aanbevolen. Zodra het vermoeden of de zekerheid bestaat dat het om een ziekteverwekker uit groep 3 gaat worden de werkzaamheden verplaatst naar een laboratorium van **beheersingsniveau 3**. Faciliteiten voor beheersingsniveau 4 zijn in Nederland (nog) niet aanwezig. Wanneer er verdenking bestaat op de aanwezigheid van groep 4 organismen worden er met dit materiaal in principe geen celkweken beënt.

Regels voor een veilige werkwijze

Biologische veiligheidswerkbanken van Klasse II beschermen de medewerker en de omgeving tegen infecties vanuit het kweekmateriaal. Bovendien beschermen ze het kweekmateriaal tegen besmetting vanuit de omgeving. Daardoor vormen deze veiligheidswerkbanken de ideale werkplek voor bijna alle celkweekwerk.

Deze bescherming in beide richtingen is alleen aanwezig wanneer de werkwijze is aangepast aan de omstandigheden in de werkbank. Verstoring van de laminaire luchtstroming dient u zoveel mogelijk te voorkomen. Gasbranders verstoren de luchtstroming volledig. Het gebruik van een gasbrander kan worden geminimaliseerd door meer gebruik te maken van disposables en door de buitenkant van buisjes en flessehalzen te ontsmetten met een desinfectans. Ook snelle armbewegingen dient u

te vermijden. Bedenk verder dat een werkbank niet beschermt tegen infecties via de handen van de medewerker.

Niet-pathogene micro-organismen zoals *Saccharomyces* (bakkergist) en *E.coli* K12 worden ingedeeld in risicogroep 1. Hierbij zijn eenvoudige hygiënische maatregelen voldoende.

Omdat iedere celkweek in principe infectierisico's inhoudt wordt aangeraden laboratoriuminrichting en werkwijze van **beheersingsniveau 2** als minimum te hanteren.

Het is voldoende als in de veiligheidswerkbank enkele filtering (ook wel met II A aangeduid) wordt toegepast. De uitstromende lucht mag terug in het laboratorium gevoerd worden als er in de werkbank niet met vluchtige gevaarlijke stoffen wordt gewerkt. Voor een aantal micro-organismen uit risicogroep 2 is echter recirculatie in de ruimte af te raden (bijvoorbeeld vaccinia virus). In zo'n geval kan gekozen worden voor een aansluiting op het luchtafvoerkanaal van de ruimte (via een 'thimble' unit of trekonderbreker). Een andere mogelijkheid is om de veiligheidswerkbank te laten voorzien van een dubbel **uitstootfilter** (ook wel met IIA+ aangeduid). De ruimteventilatie hoeft niet van HEPA filters voorzien te zijn, maar de ventilatielucht mag niet in het gebouw worden gerecirculeerd.

Wanneer er aanwijzingen zijn voor de aanwezigheid van een micro-organisme van risicogroep 3 worden de werkzaamheden in een laboratorium op **beheersingsniveau 3** uitgevoerd. Zo mogelijk wordt de uitstromende lucht van de werkbank via een "thimble" unit met de ruimteventilatielucht afgevoerd. Als dit niet mogelijk is wordt een werkbank met dubbele HEPA filtering aanbevolen (ook wel II B genoemd). De ruimte dient op onderdruk te worden gehouden en in het luchtafvoerkanaal is altijd een HEPA filter opgenomen. Voor werkzaamheden met GGO op ML-III niveau wordt in de Regeling GGO nog als extra eis gesteld dat de ventilatielucht wordt afgevoerd via een onafhankelijk kanaal.

Een andere wijze waarop infecties kunnen plaatsvinden is het prikken of snijden aan scherpe voorwerpen tijdens kweekwerkzaamheden. Uiteraard biedt het werken in een biologische veiligheidswerkbank hiertegen geen bescherming. Door zoveel mogelijk het gebruik van scherpe voorwerpen, zoals naalden en glazen pipetten, te vermijden, kan men de kans op een prikaccident aanzienlijk verkleinen. Wanneer toch een prikaccident plaatsvindt, zijn de risico's en eventuele acties afhankelijk van het materiaal waarmee men werkt.

In alle gevallen is het aan te bevelen na een prikaccident het wondje goed door te laten bloeden, af te spoelen en te desinfecteren. Bij het werken met "schone" celkweken met niet-humaan materiaal zal dit voldoende zijn. Bij mogelijk besmette celkweken en/of humaan materiaal (met name tumorcellen) is het gebruik van een wespenpompje aan te bevelen om het wondje zo goed mogelijk uit te zuigen. In dit geval dient tevens de bedrijfsarts te worden gewaarschuwd en zal een monitoringsprogramma moeten worden opgesteld. Eventueel kan nulserum worden afgenomen.

Bij patiëntenmateriaal, waarbij kans bestaat op infectie met o.a. Hepatitis-B virus en HIV kan vaak nagegaan worden wat het risico is. Hiervoor is in ziekenhuizen een prikaccidentenprotocol aanwezig, waarin ook is voorzien in een vaccinatieprogramma.

Voorschrift afvoer cel- en weefselkweek afval:

Vier categorieën cel- en weefselkweken worden onderscheiden:

- 1 Schone celkweken

- 2 (Mogelijk) besmette celkweken
- 3 Met cytostatica behandelde celkweken
- 4 GGO-celkweken

Voor deze vier typen wordt weergegeven hoe het vaste afval en hoe het vloeibare afval onschadelijk moet worden gemaakt en afgevoerd.

1 Schone celkweken

Hieronder worden primaire of continue celkweken verstaan die aantoonbaar vrij zijn van Mycoplasma en zover bekend niet besmet met bacteriën, virussen of schimmels. **Het vaste afval** zoals lege kweekflessen, pipetten etc kan met het gewone bedrijfsafval worden afgevoerd. Om verspreiding door de huisvuilcontainer te voorkomen dienen pipetten en kweekflessen voor het vervoer in een plastic zak en kartonnen doos verpakt te worden.

Het vloeibare afval mag via de gootsteen op het riool geloosd worden.

2 (Mogelijk) besmette celkweken

Hieronder worden celkweken verstaan waarvan niet aantoonbaar is dat deze vrij zijn van Mycoplasma en ook celkweken die mogelijk of zeker besmet zijn met bacteriën, virussen of schimmels (risicogroep 2 of 3).

Het vaste afval zoals lege kweekflessen, pipetten etc. kan worden geautoklaveerd. Het ge-autoklaveerde en daarom niet meer besmette afval kan bij het bedrijfsafval, verpakt in plastic zak en kartonnen doos. De vrijkomende oplossingen mogen door de gootsteen. Dit vaste afval mag ook worden afgevoerd als Specifiek ZiekenhuisAfval (SZA).

Het vloeibare afval bij voorkeur autoklaveren. Indien autoklaveren niet mogelijk is kan het afval ontsmet worden kan door toevoegen van huishoudchloor, (chloorbleekloog) of chloortabletten, waarbij de eindconcentratie actief chloor 0,1 % (w/v) dient te zijn en de inwerkingstijd tenminste 1 uur. De vrijkomende oplossingen mogen daarna door de gootsteen; eventueel vast afval kan bij het bedrijfsafval, ingepakt in plastic zak en een doos.

3 Met cytostatica behandelde celkweken

Hieronder worden celkweken verstaan die met cytostatica zijn behandeld. Al het vrijkomende materiaal van deze kweken valt onder de regels voor Specifiek Ziekenhuisafval.

4 GGO-celkweken

Hieronder worden celkweken verstaan die zijn getransfecteerd of afkomstig van genetisch gemodificeerde (transgene) dieren. Hierbij is de behandeling afhankelijk van het inperkingsniveau waarop de werkzaamheden zijn ingeschaald. Voor alle vaste en vloeibare afval heeft in het algemeen autoklaveren de voorkeur.

Voor celkweken van ML-I niveau is iedere manier van afdoding geschikt, indien de kweken aantoonbaar vrij zijn van contaminatie door Mycoplasma en andere micro-organismen. De methode dient wel te zijn gevalideerd. Te denken valt aan: overnacht bevroren bij -20°C . of behandeling met verdund huishoudchloor of chloortabletten (eindconcentratie 0,1 % w/v actief chloor gedurende tenminste 1 uur) of 1% w/v SDS. Besmet afval, zowel de vaste materialen als de kweekvloeistoffen, dat in contact geweest is met celkweken van ML-II niveau dient te worden geautoclaveerd of door middel van een andere gevalideerde methode onschadelijk te worden gemaakt. Eventueel kan het ook als SZA worden afgevoerd ter onmiddellijke verbranding. Besmet afval, zowel de vaste materialen als de kweekvloeistoffen, dat in contact geweest is met celkweken van ML-III niveau, mag niet worden vervoerd naar de vuilverbranding maar dient altijd ter plaatse te worden geautoklaveerd.

Tenslotte:

Het toevoegen van meer dan de aangegeven hoeveelheid actief chloor is niet nodig voor het ontsmetten maar zorgt wel voor een grotere milieubelasting.

Bijzondere maatregelen zijn nodig wanneer het afval ook radionucliden bevat. Hierbij is de methode van desinfectie afhankelijk van het gebruikte isotoop. Overleg met BVF en stralingsdeskundige is in dit geval beslist noodzakelijk.

Frans Heessen, BVF

Jos Henderik, milieukundig adviseur

Arbo- en Milieudienst van Radboud Universiteit en UMC St Radboud Nijmegen.

23-8-2005.