

ODESÍLATEL:

Ing. Karel Bláha, CSc.
ředitel odboru environmentálních rizik
a ekologických škod
Ministerstvo životního prostředí
Vršovická 65
100 10 Praha 10

ADRESÁT:

Vážený pan
prof. Mgr. Jaroslav Miller, M.A., Ph.D.
rektor UP v Olomouci
Univerzita Palackého v Olomouci
Křížkovského 8
771 47 Olomouc

V Praze dne

Č.j.:

Vyřizuje:

Tel.:

6. října 2017

34835/ENV/17

Ing. Rouda

267 122 554

Rozhodnutí

Ministerstvo životního prostředí jako správní úřad příslušný podle § 5 zákona č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů, (dále jen „zákon“) a § 10 zákona č. 500/2004 Sb., správní řád, ve znění pozdějších předpisů,

rozhodlo

podle § 5 odst. 8 zákona ve věci žádosti Univerzity Palackého v Olomouci, se sídlem Křížkovského 8, 771 47 Olomouc, IČ: 619 89 592, pracoviště LF UP Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc, týkající se uzavřeného nakládání ve třetí kategorii rizika s geneticky modifikovanými mikroorganismy *Leishmania major* a *Leishmania braziliensis* takto:

Univerzitě Palackého v Olomouci

Křížkovského 8, 771 47 Olomouc

se uděluje povolení

k uzavřenému nakládání s GMO
ve III. kategorii rizika.

Náležitosti povolení podle § 18 odst. 6 zákona:

Oprávněná osoba

Název: Univerzita Palackého v Olomouci, Křížkovského 8, 771 47 Olomouc

IČ: 619 89 592

Specifikace geneticky modifikovaného organismu

Geneticky modifikované organismy *Leishmania braziliensis* a *Leishmania major* exprimující fluorescenční reportérové proteiny.

Výsledné GMO budou připraveny až v laboratoři Univerzity Palackého v Olomouci, transfekcí plasmidem. Dárcovskými organismy jsou živočich *Discosoma coral* (korálovník) obsahující gen pro Coral-Derived Red Fluorescent Protein (DsRed) a *Aequorea victoria* (medúza) obsahující gen pro GFP, jehož fluorescence je zvýšena 35 krát pomocí dvou bodových mutací Ser65 za Thr a Phe64 za Leu (EGFP). Jako zdroj genetické informace bude sloužit rekombinovaný plazmid obsahující geny EGFP (pLEXSY-egfp-sat2) nebo DsRed (pLEXSY-red-sat2).

Specifikace genetické modifikace

Leishmania braziliensis a *Leishmania major* byly získány z American Type Culture Collection (ATCC) - *Leishmania braziliensis* (cat.no. ATCC30031), *Leishmania major* (ATCC30012). Jsou kultivovány v M199 médiu (Sigma-Aldrich) s přidavkem 5 mM L-glutaminu, 20% fetálního telecího séra, 100 U penicilinu a 100 ug streptomycinu.

Pro transfekci budou použity plazmidy obsahující geny EGFP (pLEXSY-egfp-sat2) nebo DsRed (pLEXSY-red-sat2). GMO vzniknou vnesením cizorodého dědičného materiálu (transfekce plazmidy).

Údaje o vektoru

Vektorem použitelným pro leishmanie je plazmid, který je po transfekci trvale přítomen v příjemci ve zkrácené formě bez kazety rezistence na ampicilin a ColiE1 ori díky ssu rekombinaci do chromosomálního ssu-lokusu. Je amplifikovatelný v plné délce v *Escherichia coli* za selekce ampicilinem.

Přítomnost sekvence v dotyčném vektoru, která předává výběrový (selektovatelný) nebo identifikovatelný fenotyp:

Vektor obsahuje kazetu rezistence na antibiotika a to Nourseothricin (streptothricin) a kazetu rezistence na ampicilin exprimovanou v prokaryotním hostiteli *Escherichia coli* při jeho amplifikaci.

Vektor nesoucí gen pro reportérový protein DsRed a gen rezistence na Nourseothricin (streptothricin) pLEXSY-red-sat2 (Jena Bioscience) bude použit pro přípravu transgenní *Leishmania major*. Vektor obsahuje i kazetu rezistence na ampicilin v prokaryotním hostiteli *Escherichia coli* použitým pro amplifikaci.

Vektor nesoucí gen pro reporterový protein EGFP a gen rezistence na Nourseothricin (streptothricin) pLEXSY-egfp-sat2 (Jena Bioscience) bude použit pro přípravu transgenní *Leishmania braziliensis*. Vektor obsahuje i kazetu rezistence na ampicilin v prokaryotním hostiteli *Escherichia coli* použitým pro amplifikaci

Transfekce bude provedena elektroporací se dvěma impulsy 10 ms a napětí 1400V. Následně budou kultivovány v přítomnosti selektivního antibiotika Nourseothricin po dobu 3 dnů ve třech malých lahvích pro tkáňové kultury o objemu 10 ml. Po uplynutí této doby budou použity pro experimenty. 10 lahvíček patogenů bude zamrazeno a uchováváno v kapalném dusíku, v prostorech pro skladování GMO. Veškeré práce budou probíhat v laboratoři pro biologické riziko 3, č. 2.21. Pro transfekci tří 100 ul lahvíček bude použito 10 x 10⁶ parazitů týden pěstované kultury. Pro transfekci bude použito 10 ug plazmidů.

Údaje o insertu

Insert obsahuje kazetu rezistence na Nourseothricin a EGFP nebo reportérový protein DsRed. Insert je integrován do chromozómu pomocí ssu rekombinace do ssu lokusu.

Zdrojem kazety rezistence na Nourseothricin, zajištěné enzymem nourseothricin N-acetyl transferasa (NAT), je *Streptomyces noursei*. Zdrojem EGFP je *Aequorea victoria* (medúza), zdrojem DsRed je *Discosoma coral* (korálovník). NAT umožňuje selekci transfektantů pomocí nourseothricinu. EGFP a DsRed umožňuje identifikovat transfektanty ve fluorescenčním mikroskopu pomocí zelené nebo červené fluorescence.

Výsledky hodnocení rizika

Geneticky modifikovanými organismy jsou prvoci *Leishmania braziliensis* (ničivka) a *Leishmania major* (ničivka) působící jako obligátní intracelulární parazité fagocytyjících buněk, kteří se množí v mononukleárním fagocytárním systému, způsobují v rozvojových a chudých zemích smrtelné onemocnění nazývané leishmanióza a časté epidemie. Leishmanie se přirozeně vyskytují v Americe, ve Středomoří, centrální Asii a na Středním východě.

Vzhledem k infekci fagocytyjících buněk a rozvoji zánětlivé reakci proti nim dominuje destruktivní reakce s tvorbou vředu a nekrotických ložisek. Sekvence použité pro tvorbu GMO neovlivňují patogenní vlastnosti příjemce s výjimkou rezistence na selekční antibiotikum Nourseothricin, které však není součástí protokolu terapie žádné formy leishmaniozy. Leishmanie jsou přenášeny vektorem, nikoliv přímým kontaktem. *Leishmania braziliensis* je antropozoonóza přenášená mezi domácími zvířaty a člověkem. Leishmaniozu je možné identifikovat sérologicky, ze vzorku kůže mikroskopicky či kultivací.

Profylaxe a terapie jsou problematické a málo účinné, onemocnění je velmi těžce léčitelné, neboť léky používané proti nim mají nízkou účinnost a relativně vysokou toxicitu. Používají se léky na bázi amphotericinu B.

V rámci navrhovaného projektu je však riziko nákazy naprosto minimalizované, neboť k nákaze (přenos na člověka) nedochází přímým kontaktem, ale je nutný přenos bodavým hmyzem (vektor - nejčastěji rody *Phlebotomus* či *Lutzomyia*). Bez těchto vektorů se infekce nepřenáší. Naopak úspěšnost přenosu pomocí vektoru je vysoká.

Toxické účinky způsobené produkty leishmanií nejsou spolehlivě dokumentovány.

Leishmanie nejsou přenašeči známých patogenů.

Není známa přímá aktivace latentních virů či provirů.

Přirozený přenos genetického materiálu mezi dárcovskými organismy a příjemci nebyl popsán.

Přímé škodlivé působení mimobuněčných produktů není uváděno.

Přímé alergenní účinky příjemců nejsou jasně dokumentovány, nicméně neadekvátní aktivace imunitního systému vůči infikovaným fagocytům je základem patofyziologie choroby.

Dárcovské organismy nejsou patogenní pro člověka ani pro jiné živočichy a rostliny. Přirozeně se vyskytují ve slané vodě. K přirozené výměně mezi dárci a příjemci nedochází

Genetické vlastnosti a fenotypové charakteristiky příjemců se nezmění, pouze výsledné GMO budou rezistentní na nourseothricin a budou produkovat fluorescenční proteiny.

Geneticky modifikované organismy se neodlišují od příjemců svojí schopností přežívat, vyjma prostředí obsahující nourseothricin, neodlišují se od příjemců způsobem nebo rychlostí reprodukce, ani svojí schopností šířit se v prostředí.

Genetická stabilita geneticky modifikovaných organismů není časově popsána, nicméně vzhledem k neschopnosti se samostatně šířit v okolí nelze předpokládat jejich převládnutí ve wild type populacích.

Geneticky modifikované organismy (živé) jsou patogenní/škodlivé stejným způsobem jako geneticky nemodifikovaní příjemci. Uvedené GMO jsou identifikovány střem, následnou inkubací v nourseothricinovém mediu a v případě nárůstu verifikovány specifickou PCR.

Vnesením plasmidů s genem pro fluorescenční protein nejsou uvedené GMO oproti wild-type organismům nikterak zvýhodněny pro přežití ve volném prostředí, ani není navýšena jejich infekčnost či patogenita.

Leishmania braziliensis je patogenní mikroorganismus, jehož potenciální škodlivý účinek je infekce. Vkládaný gen/inzert: reportérový protein EGFP má zanedbatelné riziko.

Insert obsahuje části, jejichž produkty nebo funkce jsou známy: jedná se o reportérový protein dsRed a gen rezistence na nourseothricin.

Sekvence obsažené v inzertu se nepodílejí na škodlivých vlastnostech dárce. Kazeta rezistence zajišťuje rezistenci *Streptomyces noursei* na Nourseothricin.

Ve vektoru jsou geny pro rezistence vůči streptothricinu, které mohou být rizikové pro horizontální přenos genu pro rezistenci.

Na základě posouzení potenciálních rizik geneticky modifikovaného organismu *Leishmania brasiliensis* pro zdraví člověka, zvířat, životní prostředí a biodiverzitu se doporučuje zacházet s tímto GMO v režimu uzavřeného nakládání ve 3. kategorii rizika.

V rámci navrhovaného projektu je riziko nákazy minimalizované, neboť k nákaze (přenos na člověka) nedochází přímým kontaktem, ale je nutný přenos bodavým hmyzem (nejčastěji rodu *Phlebotomus* či *Lutzomyia*). Vybavení pracoviště prakticky vylučuje proniknutí hmyzího přenašeče do prostoru nakládání s GMO. Navíc primární přenašeč *Phlebotomus* byl údajně doposud zjištěn jen v Řecku, Turecku a nejseverněji v Rumunsku.

Podle § 7 zákona a § 5 této vyhlášky je *Leishmania braziliensis* hodnocena jako jako GMO 3. kategorie rizika. *Leishmania major* je hodnocena jako GMO 2. kategorie rizika.

Podmínky nakládání

Nakládat s výše uvedenými geneticky modifikovanými organismy lze jen způsobem popsáním v žádosti č.j. 34835/ENV/17 doručené na MŽP dne 22. května 2017 a doplněné podáním na MŽP dne 31. srpna 2017, při dodržování všech uvedených podmínek, zejména:

- veškerá manipulace s geneticky modifikovaným materiálem bude probíhat za kontrolovaných podmínek minimalizujících nebo vylučujících únik transgenů do okolního prostředí,
- uvedené GMO budou připraveny v laboratoři (nebude dovezeno ani vyvezeno) a nakládáno s ním bude pouze v prostorách určených pro uzavřené nakládání v souladu opatřeními k ochraně zdraví pracovníků a v souladu s jinými právními předpisy určenými pro práci s GMO třetí kategorie rizika a práci v biologickém riziku úrovně 3 (Biosafety Level 3),

- experimentální práce naplňující účel výzkumu jsou navrženy a prováděny tak, aby riziko šíření infekčního viru bylo minimalizováno,
- pro práci s GMO budou použity laboratoře a skladovací prostory, umístěné na pracovišti Ústavu molekulární a translační medicíny (ÚMTM): 0.40 - Mrazáková místnost (tekutý N₂), 2.21 - tkáňové kultury BSL3,
- vstup do všech laboratorních prostor ÚMTM je řízen pomocí přístupových karet a je možný výhradně přes hygienickou smyčku. Laboratoř a mrazáková místnost, ve kterých bude s GMO 3. kategorie nakládáno, jsou umístěny za hygienickou smyčkou. GMO prostory jsou vybaveny uzavíratelnými plnými dveřmi s označením „GMO – vstup povolen pouze proškoleným osobám“ a opatřeny svým vlastním čipovým zařízením pro vstup, odpovídajícím počtem germicidních zářivek a centrálními rozvody plynů (dle potřeby N₂, CO₂, stlačený vzduch či vakuum). Laboratorní nábytek i podlahy jsou vyrobeny z omyvatelného, chemikáliím vzdorného materiálu. Laboratoře jsou vybaveny flowboxem, rukavicovým boxem, inkubátorem, temperovanou třepačkou a dalším běžným laboratorním vybavením (pipety, pinzety apod.),
- laboratoř pro biologické riziko stupně BSL3 (Tkáňové kultury BSL3; 2.21): vstup do laboratoře je řízený (čipovou kartou) přes mokrou hygienickou smyčku z místnosti 2.28. Laboratoř je u stropu vybavena centrálně ovládanými germicidními UV-lampami, povrchy stolů a přístrojů jsou omyvatelné. Tuto místnost je možné dekontaminovat plynem. Dekontaminace použitého materiálu bude probíhat inaktivací v parním autoklávu. Okna jsou trvale uzavřená a vzduchotechnika je opatřena dvojítm HEPA14 filtračním systémem. Laboratoř je rovněž vybavena laminárním boxem a rukavicovým boxem,
- mrazáková místnost (0.40): Vstup do místnosti je řízen pomocí čipových karet. Místnost je vybavená kryozariadením (7ks), sloužícím k uchovávání GMO nad parami dusíku a 4 mrazíci zařízeními na -80°C,
- v prostorech určených pro práci s GMO a vybavenými okny je zakázáno větrat (aby došlo k vyloučení přenašečů geneticky modifikovaných organismů, např. hmyzu a hlodavců) a cirkulace vzduchu je zajišťována výhradně pomocí vzduchotechniky. Veškerý kontaminovaný materiál je desinfikován a likvidován jako infekční materiál (chemická desinfekce, autokláv),
- všichni zaměstnanci nakládající s GMO budou proškoleni před zahájením práce v BSL3 laboratoři, pro práci s GMO 3. kategorie před zahájením nakládání, včetně metod a postupů dekontaminace v případě havárie. Platnost školení je 1 rok,
- do vybraných prostor určených pro práci s GMO mají přístup i pracovníci, kteří s GMO nepracují. Tito pracovníci jsou pravidelně proškoleni o pravidlech práce v laboratoři, která nakládá s GMO. Záznam o tomto proškolení je zakládán,

- případné návštěvy jsou před vstupem do GMO prostor rovněž poučeny, o čemž je proveden záznam do sanitační knihy,
- pracovníci jsou oprávněni vstupovat do prostor pro práci s GMO a pracovat s nimi v těchto prostorách pouze za splnění následujících podmínek: jsou řádně proškoleni pro tuto práci v souladu s plánem proškolení, používají svrchní ochranný oděv (plášť) či laboratorní oděv a jednorázové rukavice, nejsou pod vlivem alkoholu, drog, halucinogenních látek nebo jakýchkoli jiných látek, které by mohly snížit jejich schopnost dodržovat všechny povinnosti při práci s GMO, příp. nepociťují stav, který by mohl tuto schopnost ovlivnit. Experiment, který budou provádět, musí být schválen odpovědnou osobou.
- pracovníci jsou při práci v uzavřených prostorách povinni dodržovat zásady osobní hygieny se zřetelem k prevenci šíření GMO, tj. zejména jsou povinni i při používání rukavic a dalších ochranných pomůcek po ukončení práce použít sprchu s desinfekčním mýdlem. V případě podezření na potřísnění pokožky jsou povinni tuto bezodkladně ošetřit desinfekčním aerosolem nebo otřením 70% etanolem, po kterém následuje důkladné umytí desinfekčním mýdlem. Při podezření na potřísnění ochranného pláště GMO jsou povinni tento tentýž den bezodkladně po ukončení práce nebo při výrazném potřísnění ihned odložit do nádoby pro shromažďování ochranných oděvů,
- při práci s GMO jsou pracovníci povinni dodržovat postupy, uvedené v provozním řádu. Po ukončení pracovní činnosti jsou pracovníci povinni ošetřit všechny povrchy, které mohly být kontaminovány GMO, vhodným desinfekčním roztokem. Dále jsou povinni zapnout nejméně na 1 hodinu germicidní UV-lampy, použité osobní ochranné pomůcky odložit do uzavřených pytlů na infekční odpad či desinfekčních roztoků a při východu z GMO laboratoře použít sprchu s desinfekčním mýdlem,
- pracovníci jsou povinni dbát obecných pravidel bezpečnosti práce, zejména neponechávat plamen kahanu bez dozoru. Pokud nebude používán kratší dobu, převádět plynový kahan na svítivý plamen a pokud nebude používán delší dobu, je nutné bezodkladně uzavírat přívod plynu a dbát na bezpečnou manipulaci s hořlavinami a elektrickými přístroji,
- pracovníci jsou poučeni, kde se nachází hlavní uzávěr vody, plynů a hlavní elektrický jistič. V případě pochybností o funkčnosti nebo příslušnosti uzávěrů je nutné bezodkladně informovat pohotovostní havarijní službu FN Olomouc, kl. 98-4217,
- na pracovišti je zejména zakázáno jíst, pít a kouřit v prostorách laboratoře, přivádět návštěvy bez souhlasu osoby odpovědné (či osoby jí pověřené), vpouštět do prostor laboratoře zvířata, pěstovat v nich rostliny a provádět jakékoli

další činnosti, u kterých lze předpokládat riziko rozšíření GMO mimo určený prostor manipulace,

- pracovníci používají k osobní ochraně jednorázové rukavice a ochranný oděv (plášť). Při práci s GMO ve 3. kategorii rizika jsou pracovníci povinni nosit jednorázový plášť, který při odchodu z laboratoře likvidují jako biologický odpad. Pracovní pomůcky odpovídají závazným pracovním postupům,
- pověřená osoba vede evidenci uložených GMO a jejich množství. GMO mohou být vyzvednuty z mrazicího zařízení pouze se souhlasem odpovědné/pověřené osoby za účelem provedení naplánovaného a schváleného experimentu nebo za účelem likvidace,
- kultivace GMO - příprava transgenních GMO a jejich kultivace probíhá výhradně v laboratoři 2.21, dle Žádosti o nakládání s GMO 3. kategorie rizika. Před zahájením práce se pracovník přesvědčí, jestli je řádně zajištěno uzavření místnosti a jestli má připraveny všechny pomůcky a přístroje potřebné pro správný průběh nakládání s GMO a příp. pro likvidaci havárie (viz havarijní plán). Práce probíhá v boxu a veškerý použitý materiál je chemicky inaktivován a vkládán do nádob pro překládací autokláv. Všechny přístroje, prostory a opakovaně používaný materiál jsou dle vhodnosti desinfikovány 70% etanolem či jiným vhodným přípravkem (Savo, Persteril apod.) či autoklávováním, v laboratoři lze rovněž využít plynou desinfekci. V případě potřeby uchování (zamražení) jsou GMO přenášeny v zamrazovacích zkumavkách, umístěných do nepropustného obalu, do místnosti č. 0.40. Obaly jsou ihned po použití desinfikovány,
- výčet a množství GMO - Celkové množství připraveného GMO: pro transfekci tří 100 ul lahviček bude použito 10 x 10⁶ parazitů týden pěstované kultury *Leishmania braziliensis* resp. *Leishmania major*. Pro transfekci bude použito 10 ug plazmidů pro fluorescenční reportérové proteiny. Transfekce bude provedena elektroporací se dvěma impulsy 10 ms a napětí 1400V. Následně budou kultivovány v přítomnosti selektivního antibiotika po dobu 3 dnů ve třech malých lahvích pro tkáňové kultury o objemu 10 ml. Po uplynutí této doby budou použity pro experimenty. 10 lahviček patogenů bude zamrazeno a uchováváno v kapalném dusíku, v prostorech pro skladování GMO,
- GMO používané na pracovišti jsou uchovávány ve vhodném médiu (kultivační medium či zamrazovací medium): v lednici, při cca 4°C (místnost č. 2.21), v mrazicím pultu, při cca - 20°C (místnost č. 2.21) v mrazicím zařízení, při cca 80°C či nad parami dusíku (místnost č. 0.40),
- veškeré odpady i jiný materiál vycházející z laboratoře bude inaktivován aplikací desinfekčního prostředku a následným autoklávováním. GMO určeno k likvidaci je nejprve inaktivováno vhodným přípravkem (Savo, Persteril apod.) a následně v uzavřeném obalu autoklávováno,

- pevné odpady, u kterých je podezření nebo jistota kontaminace GMO, jsou po jejich desinfekci (autokláv či vhodný desinfekční prostředek – Incidur, Savo, Persteril) shromažďovány v označených pevných PE pytlích, které jsou pevně uzavřeny a předány k odstranění jako odpad 180203 Katalogu odpadů (Odpady, na jejichž sběr a odstraňování nejsou kladeny zvláštní požadavky s ohledem na prevenci infekce). Finální odstraňování provádí FN Olomouc, v níž je ÚMTM situován, dle Směrnice Sm-K001 o nakládání s odpady,
- po konečném odstranění musí mít odpad katalogové číslo, pod které je povinen původce odpad zařadit (např. po autoklávování lze zařadit jako k. č. 18 01 04 – ostatní odpad). Odpad z GMO musí být označen katalogovým číslem a symboly dle vyhlášky 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady, v platném znění a není možné jej odstraňovat jako „biologický odpad“ (biologický odpad neexistuje, proto není možné jej ukládat do nádob pro biologický odpad),
- tekuté odpady v nádobách jsou buď smíšeny s odpovídajícím množstvím dezinfekčního prostředku (Savo), nebo pokud to není možné, jsou uzavřené shromažďovány v kontejneru a sterilizovány parním sterilizátorem. Dále budou odstraňovány do kanalizace určené pro chemický a laboratorní odpad. Účinnost zneškodnění GMO je kontrolována 2x ročně, kultivací se selekčními antibiotiky,
- místo uložení dokumentace o nakládání s geneticky modifikovanými organismy vedené podle § 19 písm. b) zákona: veškerá dokumentace je uložena přímo v Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc,
- evidence o provozu zařízení je vedena v následujících knihách:
 - 1/ Registrační karty - ke každému typu GMO je vedena číslovaná registrační karta, do které jsou pracovníci povinni zaznamenávat chronologicky jednotlivé experimenty s GMO s uvedením následujících údajů: data nakládání, osoba(y) provádějící nakládání, množství připraveného GMO materiálu (objem u bakteriální kultury, přibližný počet buněk u buněčné linie), označení experimentu - stručná charakteristika a popis experimentu (odkaz na standardní operační postup), popřípadě odkaz na podrobnější záznam experimentu v laboratorní dokumentaci pracovníka, případně údaje o jakýchkoli mimořádných událostech v průběhu experimentu a o jejich řešení s podpisem odpovědné osoby podle bodu 4, či osoby jí pověřené. Dále eviduje množství a typ materiálu uskladněného pro další použití i údaje o tom, jaký materiál byl použit a v jakém množství.
 - 2/ Sanitační kniha - v sanitační knize je osoba pověřená sanitací povinna zaznamenávat chronologicky jednotlivé provedené sanitace s uvedením následující údajů – datum sanitace, způsob a rozsah provedení sanitace (použitý

desinfekční prostředek, doba působení germicidních lamp), v případě mimořádné sanitace jméno a podpis pracovníka, který o sanitaci rozhodl, důvod provedení této sanitace a podpis odpovědné osoby či osoby jí pověřené. V sanitační knize je rovněž odpovědná osoba povinna zaznamenávat datum a výsledek namátkových a pravidelných čtvrtletních kontrol funkčnosti a používání zabezpečovacích prvků, každý zápis je doplněn podpisem odpovědné osoby podle bodu 4, či osoby jí pověřené,

- ke každé kontrole technického zařízení BSL3 je veden zápis, který je uchováván u vedoucího údržby. Evidence kontrol výskytu GMO, oprav vnitřního vybavení BSL3, validací biohazard boxů, prováděných sanitací a dalších záležitostí týkajících se chodu BSL3 jsou vedeny v provozním deníku,
- pracovníci údržby jsou povinni při údržbářských pracích v prostorách pro práci s GMO dodržovat pravidla provozního řádu a používat ochranné oděvy pro práci v GMO laboratoři. Jsou povinni dbát pokynů vedoucího BSL3 laboratoře nebo jím pověřeného pracovníka, v jejichž prostorách údržbu provádějí. Musí být vždy doprovázeny pracovníkem proškoleným pro práci s GMO. Pracovníci pověřeni zodpovědnou osobou (či osobou jí pověřenou) jsou povinni provádět zejména tyto činnosti při údržbě: odmrazování ledniček a mrazáků, aby byla zajištěna jejich účinnost, provádět údržbu běžného zařízení a odstraňování nečistot, desinfikovat pracovní plochy a provádět sterilizaci flowboxů,
- externí pracovníci provádějící servis a údržbu jsou poučeni o práci v GMO laboratoři a vybavení stejnými ochrannými pomůckami, jako běžní pracovníci, včetně jednorázových návleků a jednorázového pláště. Náradí a výměnné pracovní díly jsou desinfikovány vhodným přípravkem (Savo, líh, incidur, persteril) či sterilovány v parním autoklávu,

Další podmínky nakládání stanovené podle § 5 odst. 10 zákona

- Univerzita Palackého v Olomouci musí v souladu s § 19 písm. c) zákona každoročně předat ministerstvu v listinné a elektronické podobě vždy k 15. únoru kalendářního roku přehled geneticky modifikovaných organismů, údaje o jejich množství, o způsobu nakládání s nimi a vyjádření k přezkoumání hodnocení rizika za uplynulý kalendářní rok a v souladu s § 19 písm. d) zákona zaslat do 60 dnů od ukončení nakládání s GMO závěrečnou zprávu o průběhu, důsledcích této činnosti, zejména s ohledem na rizika ohrožení zdraví a životního prostředí.
- Univerzita Palackého v Olomouci musí v souladu s § 19 písm. h) zákona poskytnout správním orgánům (Ministerstvo životního prostředí, ČIŽP) podle § 28 a § 31 až 33 součinnost při kontrole prostorů a zařízení určených k nakládání s GMO nebo prostorů a zařízení, v nichž k tomuto nakládání dochází nebo může docházet, včetně poskytnutí písemností a kdykoliv v průběhu nakládání strpění bezúplatného odebrání vzorků pro kontrolní účely.

Účel nakládání

Cílem studie a jedním z přístupů ve vývoji účinných terapeutických opatření je identifikovat aktivní sloučeniny uvnitř infikovaných lidských buněk za použití in vitro testů, využívajících parazity obsahující reportérové fluorescenční proteiny.

Předložená studie je zaměřena na identifikaci nových lékových sloučenin s aktivitou proti *Leishmania braziliensis* a *Leishmania major*. Jedná se o součást dlouhodobého společného projektu na vývoj účinných terapeutických opatření proti leishmanióze.

Hledání nových potenciálních léčiv je jedním z přístupů ke zvládnutí této nemoci. Pro jejich hledání je nezbytná identifikace aktivních sloučenin za použití in vitro testů, využívajících parazity obsahující reportérové fluorescenční proteiny. Pro tyto cíle je potřeba vyvinout transgenní *Leishmania braziliensis* a *Leishmania major* exprimující fluorescenční reportérové proteiny, což umožní relativně rychlé vytipování nadějných sloučenin inhibujících růst Leishmanie.

Další požadavky na označení

Pro nakládání s GMO platí obecné podmínky označování geneticky modifikovaného organismu, které je dáno zákonem.

Místo uzavřeného nakládání

Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc, plánuje uzavřené nakládání s výše uvedenými GMO v laboratoři pro biologické riziko stupně BSL3 (Tkáňové kultury BL3; 2.21) do které je vstup řízený (čipovou kartou) přes mokrou hygienickou smyčku z místnosti 2.28., a v mražákové místnosti (0.40) do které je vstup též řízen pomocí čipových karet (kryoprezervace - tekutý dusík).

Požadavky na monitoring a podávání zpráv o jeho výsledcích

Řádné plánované kontroly jsou prováděny odpovědnou osobou (či osobou jí pověřenou) čtvrtletně a zahrnují celkovou kontrolu prostoru a kontrolu dodržování provozního řádu a havarijního plánu. Kontrola výskytu GMO v prostředí laboratoře (povrchy pracovních stolů, používané nádoby, pipety, podlahy a stěny) je kontrolována systematicky, střem a kultivací kultivačním mediu se selekčním antibiotikem (nourseothricin), případný nárůst je identifikován pomocí PCR.

Je-li výsledek pozitivní, je provedena technická kontrola funkčnosti desinfekčních prostředků, provedeno šetření, zda jsou všemi osobami dodržovány zásady práce s GMO a provedeno opatření k nápravě. Do té doby bude pozastavena veškerá manipulace s GMO. Mimořádné kontroly jsou prováděny odpovědnou osobou namátkově a dále vždy při výskytu pochybností o dodržování předpisů o nakládání

s GMO, jsou zaměřeny podle potřeby. Minimálně 1× za dva roky je prováděna validace biohazard boxu II. třídy.

Všechny projevy jakýchkoliv nežádoucích účinků a nestandardních situací vyplývajících z uzavřeného nakládání s GMO budou okamžitě nahlášeny ministerstvu a příslušným úřadům.

Doba platnosti povolení

Doba nakládání s GMO je od doby nabytí právní moci rozhodnutí MŽP do konce roku 2019.

O d ů v o d n ě n í

Dne 22. května 2017 byla doručena na MŽP žádost Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Ústavu molekulární a translační medicíny, se sídlem Hněvotínská 5, 775 15 Olomouc, (dále jen „žadatel“), o udělení povolení k uzavřenému nakládání s geneticky modifikovanými organismy ve 3. kategorii rizika (*Leishmania braziliensis* a *Leishmania major*). Tato žádost byla evidována pod č.j. MŽP 34835/ENV/17.

Ministerstvo životního prostředí posoudilo výše uvedenou žádost a dne 25. května 2017 ji podle § 5 odst. 4 zákona zaslalo k vyjádření Ministerstvu zdravotnictví, Ministerstvu zemědělství a Olomouckému kraji. MŽP neobdrželo žádné vyjádření veřejnosti ve smyslu § 5 odst. 6 zákona. Žádost v elektronické podobě byla též zaslána k posouzení České komisi pro nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty (ČK GMO) a určeným odborným posuzovatelům.

Univerzitě Palackého v Olomouci bylo zasláno potvrzení o přijetí žádosti dne 25. května 2017.

Dne 25. června 2017 vydala své stanovisko k žádosti ČK GMO. Ve svém stanovisku uvedla, že je nutné z formálního hlediska doplnit v textu žádosti informace o zdroji plazmidu (vektoru), který má být použit k transformaci hostitele a o použité gm bakterii *Escherichia coli*, v přílohách hodnocení rizika a v havarijním plánu není specifikováno, které vývojové formy prvoka budou kultivovány a není uveden možný následek havárie. V hodnocení účinků přímých a okamžitých, v hodnocení opožděných nebo kumulativních účinků je riziko infekce odhadováno jako nízké a proto je nutné tyto údaje přehodnotit. Chybí hodnocení možnosti přenosu příjemce – tedy patogenního organismu. Chybí hodnocení vlivu a působení vektorů přenosu (hmyz) a chybí popis bezpečného transportu a uložení GMO. V popisu pracoviště chybí umístění autoklávu, na který je v materiálech odvolávka v souvislosti se standardní likvidací odpadů. Nelze tedy posoudit, zda způsob likvidace vyhovuje. Není uvedeno, zda prostory určené jsou pro nakládání s GMO klasifikované čisté

prostory. Je nutné doplnit, zda je provedena kvalifikace a validace systému vzduchotechniky a prověřit, zda pro pracoviště zařazené do kategorie BSL3 je vybavení ochrannými pomůckami dostatečné. Dále je třeba popsat jakým způsobem jsou řešeny plynné odpady (klimatizace, HEPA filtry) a doplnit údaje o záznamech provedených kontrol na přítomnost GMO.

Ministerstvo zdravotnictví podáním doručeným MŽP dne 26. června 2017 uvedlo, že je nutné pro zajištění bezpečného odstranění a minimalizaci rizik z odpadů přepracovat nakládání a zařazení odpadů GMO ve všech dokumentech dle zákona o odpadech, zvýšit četnost kontroly účinnosti dekontaminace na 4x za rok a nahradit termín „výroba“ termínem „příprava“, nebo úplně vypustit.

Na základě zjištěných nedostatků v žádosti byla Univerzita Palackého v Olomouci vyzvána k jejich odstranění dle zaslaných připomínek a zároveň bylo vydáno usnesení o přerušení řízení ve věci žádosti do doby odstranění vad podané žádosti, nejpozději do 30 dnů ode dne doručení tohoto usnesení.

Dne 14. července 2017 byla na MŽP doručena žádost Univerzity Palackého v Olomouci o prodloužení termínu určeného k odstranění nedostatků v žádosti o jeden měsíc z důvodu personálních změn na pracovišti i dovoleným v průběhu prázdnin. Původní termín je příliš krátký pro to, aby byly změnové dokumenty zaslány v odpovídající kvalitě. MŽP tuto žádost na základě uvedeného zdůvodnění akceptovalo a stanovilo termín k zaslání opravené a doplněné žádosti do 31. srpna 2017.

Dne 8. srpna 2017 MŽP upozornilo dopisem Univerzitu Palackého v Olomouci, že pokud v poskytnuté lhůtě neodstraní nedostatky žádosti, které brání pokračování v řízení, bude řízení o žádosti podle § 66 odst. 1 písm. c) správního řádu usnesením zastaveno.

MŽP dne 31. srpna 2017 obdrželo žádost upravenou dle zaslaných připomínek a konstatovalo, že připomínky a doporučení odborných posuzovatelů na doplnění byly akceptovány.

Dne 25. září 2017 zaslalo Ministerstvo zdravotnictví připomínku k opravené žádosti, která se týkala doporučení o nakládání s odpady. Tato připomínka byla zapracována do rozhodnutí MŽP.

MŽP dne 8. září 2017 zaslalo v souladu se zákonem č. 634/2004 Sb., o správních poplatcích, žadateli výzvu k zaplacení správního poplatku za vydání povolení k uzavřenému nakládání s GMO 3. kategorie rizika.

Dne 11. října 2017 žadatel požadovanou částku zaplatil a zaslal MŽP informaci a potvrzení o zaplacení správního poplatku.

Vzhledem k tomu, že žádost o udělení povolení k uzavřenému nakládání s GMO 3. kategorie rizika (příprava transgenních prvoků *Leishmania braziliensis* a *Leishmania major* exprimujících fluorescenční reportérové proteiny a vypracování metodiky pro následnou in vitro identifikaci nových lékových sloučenin), po všech úpravách a doplnění vyhovuje ustanovením zákona a jeho prováděcích předpisů a nakládání v režimu uzavřeného nakládání s GMO 3. kategorie rizika za daných podmínek nepředstavuje zvýšené riziko pro zdraví člověka a zvířat ani pro životní prostředí, a dále s přihlédnutím ke kladným stanoviskům MZe, MZ a ČK GMO, a dalším výše uvedeným skutečnostem, vydává MŽP žadateli povolení k uzavřenému nakládání s GMO 3. kategorie rizika (příprava transgenních prvoků *Leishmania braziliensis* a *Leishmania major* exprimujících fluorescenční reportérové proteiny a vypracování metodiky pro následnou in vitro identifikaci nových lékových sloučenin).

P o u č e n í

Proti tomuto rozhodnutí je možno podle § 152 odst. 1 zákona č. 500/2004 Sb., správní řád, podat do 15 dní od jeho oznámení rozklad, o němž rozhodne ministr životního prostředí, a to podáním adresovaným Ministerstvu životního prostředí, Vršovická 65, 100 10 Praha 10.

Ing. Karel Bláha, CSc.
ředitel odboru

Toto rozhodnutí obdrží:

- A. Účastník řízení do vlastních rukou:
Univerzita Palackého v Olomouci, se sídlem Křížkovského 8, 771 47 Olomouc, pracoviště LF UP Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny, Hněvotínská 5, 779 00 Olomouc
- B. Na vědomí:
 - 1. Ministerstvo zdravotnictví
 - 2. Ministerstvo zemědělství
 - 3. Olomoucký kraj