

ODESÍLATEL:

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

ADRESÁT:

Vážený pan
brig. gen. prof. Ing. Bohuslav Přikryl,
Ph.D.
rektor – velitel Univerzity obrany
Univerzita obrany
Kounicova 156/65
662 10 Brno

V Praze dne

Č.j.:

Vyřizuje:

Tel.:

10. května 2018

MZP/2018/750/1174

Ing. Routa

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 obrany, Fakulty vojenského zdravotnictví, Katedry molekulární patologie a biologie, se sídlem Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, IČ: MO Praha 601 62 694 (dále jen Univerzita obrany), týkající se uzavřeného nakládání ve třetí kategorii rizika s geneticky modifikovanými kmeny bakterie *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* na pracovišti FVZ Hradec Králové takto:

**Univerzitě obrany, Fakultě vojenského zdravotnictví, Katedře molekulární
patologie a biologie**

Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové

se uděluje povolení

k uzavřenému nakládání s geneticky modifikovanými organismy
ve III. kategorii rizika.

Náležitosti povolení podle § 18 odst. 6 zákona:

Oprávněná osoba

Název: Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra molekulární patologie a biologie, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové.

IČ: MO Praha 601 62 694

Specifikace geneticky modifikovaného organismu

Deleční geneticky modifikované organismy (GMO) *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*, kmen Schu, s odstraněnými geny FTT1075 a FTT1076, jejichž rodičovským organismem je *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, kmen Schu (typA). Tento kmen gramnegativní, fakultativně intracelulární bakterie *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*, kmen Schu, pochází ze Sbírky zoopatogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, Brno, číslo kmene CAPM5600, izolováno z člověka, Ohio, USA.

U GMO *Francisella tularensis* Schu Δ FTT1075 a *Francisella tularensis* Schu Δ FTT1076 budou odstraněny geny FTT1075 nebo FTT1076, v případě ostatních GMO se jedná o komplementaci, tj. zpětné navrácení uvedených genů do příslušných delečních mutantů. Jiné genetické vlastnosti se nezmění.

Tyto kmeny se přirozeně nevyskytují, jedná se tedy o GMO. Budou vytvořeny na pracovišti v laboratoři s úrovní technického zabezpečení (BSL) 3, která je určená pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika, a budou sloužit pouze pro účely vědecko-výzkumného projektu.

Seznam GMO 3. kategorie rizika:

F. tularensis Schu Δ FTT1075

F. tularensis Schu Δ FTT1076

F. tularensis Schu / Δ FTT1075+FTT1075

F. tularensis Schu / Δ FTT1076+FTT1076

F. tularensis Schu Δ FTT1075 (pKK289Km::FTT1075)

F. tularensis Schu Δ FTT1076 (pKK289Km::FTT1076)

Fenotypové charakteristiky GMO s odstraněnými geny FTT1075 a FTT1076 nejsou známy a budou předmětem výzkumu. U komplementovaných GMO dojde navrácením genů na původní místo ve chromozomální DNA k obnovení původního fenotypu. Komplementované kmeny tedy budou genotypově i fenotypově zcela identické s původním kmenem *Francisella tularensis* Schu.

Specifikace genetické modifikace

Francisella tularensis Schu Δ FTT1075 (pKK289Km::FTT1075) a *Francisella tularensis* Schu Δ FTT1076 (pKK289Km::FTT1076) jsou GMO připravené komplementací in trans a lze je jednoznačně identifikovat kultivací v růstovém médiu za přítomnosti kanamycinu a následným ověřením na přítomnost genů FTT1075 a FTT1076.

Výsledné GMO budou získány vynětím části dědičného materiálu. U *Francisella tularensis* Schu Δ FTT1075 dojde k deleci genu FTT1075, použitou metodou bude homologní rekombinace chromozomu s nereplikativním vektorem, u *Francisella tularensis* Schu Δ FTT1076 dojde k deleci genu FTT1076, použitou metodou bude homologní rekombinace chromozomu s nereplikativním vektorem.

U delečních GMO budou provedeny fenotypové analýzy za účelem zjištění případných rozdílů v porovnání s původním kmenem *Francisella tularensis* Schu.

Údaje o vektoru

Identita vektorů

pDM4: nereplikativní (sebevražedný) vektor pDM4 je odvozen od vektoru pDM1 a nese R6K replikační počátek, obsahuje gen pro **chloramfenikol acetyltransferázu**, kódující rezistenci ke chloramfenikolu, dále nese gen **sacBR** z *Bacillus subtilis* pro sacharózovou selekci (ve výsledném GMO není tento vektor přítomný). Nereplikativní vektor **pDM4** se zaklonovanými konstrukty pro deleci nebo komplementaci (FTT1075, FTT1076) bude do příslušného kmene bakterie *Francisella tularensis* vnesen konjugací s *E. coli* S17-1 λ pir (nesoucí nereplikativní plazmid pDM4 s konstruktem). Po konjugaci a následné sacharózové selekci dojde k homologní rekombinaci a deleci daného genu na chromozomu. Při následné sacharózové selekci dojde k odstranění vektoru. Vektor **pDM4** ve výsledném GMO **nebude** přítomen.

pKK289Km::GFP: replikativní vektor pKK289Km::GFP je odvozen od vektoru pKK214 a navíc exprimuje Tn5-odvozený gen pro rezistenci ke kanamycinu. Gen *gfp* zůstává pod kontrolou promotoru pro GroES z *Francisella tularensis* LVS). Gen *gfp* je při vnesení genů FTT1075 nebo FTT1076 odstraněn. Oba vektory jsou použitelné pro kmeny *Francisella* ssp. Lze je také vnášet do *E. coli*. Vektor bude vnesen do *Francisella tularensis* Schu Δ FTT1075 a *Francisella tularensis* Schu Δ FTT1076 elektroporací.

pKK289::Km (bez *gfp* genu) **bude** přítomný v GMO *Francisella tularensis* Schu ΔFTT1075 (pKK289Km::FTT1075) a *Francisella tularensis* Schu ΔFTT1075 (pKK289Km::FTT1075); pro jeho zachování je nezbytné výsledné GMO kultivovat v přítomnosti kanamycinu. Vektor pKK289Km neobsahuje neznámé části.

V případě komplementace *in cis* se jedná o zpětné navrácení původních genů, čímž dojde k plnému obnovení genotypu a fenotypu.

Údaje o insertu

Insert se ve výsledném geneticky modifikovaném organismu nachází na volném plazmidu. U GMO *Francisella tularensis* Schu ΔFTT1075 (pKK289Km::FTT1075) a *Francisella tularensis* Schu ΔFTT1076 (pKK289Km::FTT1076) bude součástí plazmidu **pKK289Km**. U geneticky modifikovaných *Francisella tularensis* Schu/ΔFTT1075+FTT1075 a *Francisella tularensis* Schu/ΔFTT1076+FTT1076 jsou geny zpětně vloženy na původní místo do chromozomu.

Výsledky hodnocení rizika

V laboratoři pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika se nakládá s GMO odvozenými od vysoce virulentního kmene Schu *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* (typ A), původce onemocnění tularémie. Výskyt tohoto typu *Francisella tularensis* je znám v oblastech Severní Ameriky, v Evropě se pak vyskytují méně virulentní kmeny subsp. *holarctica* (typ B).

Jedná se o vysoce virulentní typ bakterie, kdy k navození onemocnění stačí pouhých několik bakterií (10 CFU v případě *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*), a snadno se šíří prostřednictvím aerosolu. Z tohoto důvodu byla zařazena do kategorie A seznamu potencionálních biologických zbraní. Ochrana v podobě účinné a bezpečné vakcíny však doposud neexistuje, právě z důvodu neznalosti molekulárních mechanismů patogeneze. Tato problematika je hlavním cílem dlouhodobých projektů na pracovišti Univerzity obrany, doposud však byl stěžejní výzkum zaměřen pouze na analýzu méně virulentních kmenů *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* (typ B).

Francisella tularensis má široké spektrum hostitelů zahrnující jak bezobratlé, tak i obratlovce, včetně savců, ptáků, plazů, ryb. Postihuje především zajíce a polní hlodavce, ale je přenosná i na jiná zvířata a na člověka.

Postižená zvířata ztrácejí plachost, potácejí se při pohybu, jsou malátná a dají se snadno chytit. Rezervoárem nákazy v přírodě jsou infikovaní hlodavci. Možnými vektory v oblasti hostitelů včetně necílového organismu jsou považováni hematofágní členovci (komáři, mouchy, blechy, ovádi, klíšťata). K infekci dochází přes dýchací ústrojí, trávicí ústrojí, přes spojivky nebo kůži.

Pro profylaxi a léčbu onemocnění u lidí a zvířat jsou lékem volby fluorochinolony, alternativa - tetracykliny; u těžkých případů vyžadující hospitalizaci se podávají aminoglykosidy (streptomycin, gentamycin). Důležité je včasné zahájení léčby. Rezistence na tato antibiotika zatím nebyla popsána.

Nejsou známy přímé alergické účinky, toxické účinky produkce toxinu u *Francisella tularensis* obecně nebyly zatím popsány, není ani přenašeč známých patogenů, dále nebyla popsána možnost aktivace latentních virů (provirů), nebylo popsáno, zda dochází k přirozené výměně dědičného materiálu mezi dárcovským organismem a příjemcem.

GM bakteriím *Francisella tularensis* Schu ΔFTT1075 a *Francisella tularensis* Schu ΔFTT1076 jsou z chromozomální DNA odstraněny příslušné geny (FTT1075, resp. FTT1076), jejichž funkce není přesně známá. Z tohoto důvodu je nutné tyto deleční GMO považovat za stejně patogenní jako původní kmen *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* (typA) kmen Schu, který je zařazen do 3. kategorie rizika. Lze předpokládat, že odstraněním těchto genů nedojde ke zvýšení patogenity.

Komplementované mutantní kmeny se nebudou lišit od původního kmene svojí schopností přežívat. V případě delečních mutantních kmenů bude schopnost přežívat experimentálně ověřována, je možné, že schopnost přežívání bude snížena.

Komplementované mutantní kmeny se nebudou odlišovat od příjemce nebo rodičovského organismu ani způsobem nebo rychlostí reprodukce. U delečních mutantních kmenů toto bude experimentálně ověřováno – předpokládá se, že rychlost reprodukce zůstane nezměněná nebo snížena.

U delečních mutantních kmenů se nepředpokládá odlišnost od rodičovského organismu, pokud jde o schopnost šířit se v prostředí. U komplementovaných *in cis* mutantních kmenů tato schopnost nebude odlišná. U GMO, připravených komplementací *in trans*, představuje přítomnost plazmidu selekční nevýhodu. Za nepřítomnosti příslušných antibiotik dojde ke ztrátě plazmidu, za vzniku původních delečních mutantních kmenů.

V případě delece *in cis* komplementace je výsledné GMO geneticky stabilní. GMO připravené komplementací *in trans* jsou stabilní pouze v přítomnosti příslušných antibiotik. Nepřítomnost antibiotik vede ke ztrátě plazmidu, za vzniku bakterie s delecí příslušných genů.

Francisella tularensis lze diagnostikovat sérologicky (ELISA, aglutinace), pomocí PCR; kultivačně je náročná, vyžaduje agary obohacené o cystein a železo. Experimentálně podložené údaje o přesné funkci a významu produktů genů FTT1075 a FTT1076 zatím neexistují a jsou předmětem výzkumu, ke kterému budou GMO

uvedené v této žádosti využity. V případě GMO s vloženými inzerty se jedná o zpětné vložení (komplementaci) genů do kmenů, ve kterých byly geny z chromozomu zcela odstraněny (příslušná GMO jsou součástí tohoto oznámení). Nepředpokládá se tedy, že by došlo ke změně patogenních nebo škodlivých vlastností oproti původnímu kmeni.

Vzhledem k rodičovskému organismu případně příjemci, kterým je *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* kmen Schu (typ A) spadajícímu do skupiny biologických činitelů 3. kategorie rizika, lze nakládání se všemi GMO uvedenými v této žádosti zařadit do třetí kategorie rizika.

Podmínky nakládání

Nakládat s výše uvedenými geneticky modifikovanými organismy lze jen způsobem popsáním v žádosti č.j. MZP/2018/750/71 doručené na MŽP dne 10. ledna 2018 a doplněné podáním na MŽP dne 26. března 2018, při dodržování všech uvedených podmínek, zejména:

- veškerá experimentální práce naplňující účel výzkumu s geneticky modifikovaným materiálem bude probíhat za kontrolovaných podmínek minimalizujících nebo vylučujících únik transgenů do okolního prostředí mimo uzavřené prostory,
- uzavřené nakládání s GMO 3. kategorie rizika bude probíhat výhradně v laboratoři s úrovní 3 technického zabezpečení (ÚTZ 3, synonymum BSL3). Tato laboratoř je náležitě vybavená a opatřená technickými prostředky zamezujícími úniku GMO do prostředí a ohrožení zdraví osob, zvířat a druhové rozmanitosti, s následnou úplnou a bezpečnou likvidací připravených nebo použitých GMO. Vývoz GMO se nepředpokládá,
- veškeré činnosti v této laboratoři musí být podřízeny minimalizaci rizika kontaminace povrchů, ochranného oblečení, či v konečném důsledku nákazy. S infekčním materiálem lze pracovat pouze v laminárním flowboxu nebo v uzavřených systémech a to tak, aby se na nejvyšší možnou míru omezil vznik infekčního aerosolu,
- do laboratoře je zakázán vstup osob, které nebyly řádně proškoleny pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika,
- do laboratoře je zakázán vstup osob bez předepsaného pracovního oděvu a ochranných pomůcek,
- laboratoř určená pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika a s ní související prostory (zároveň i skladování, a příslušné vstupní a výstupní prostory jsou součástí uzavřeného komplexu) jsou umístěny v 1. NP, v zadní části budovy

se samostatným trvale uzavřeným vchodem. Samotný komplex, ve kterém se laboratoř nachází, je oddělen od ostatních prostor trvale uzavřenými dveřmi s označením „Biohazard“, vybavenými vlastním čipovým zařízením pro vstup. Vstup do těchto prostor je povolen jen proškoleným osobám, které mají vstup povolen na základě rozkazu děkana FVZ UO. Karty jsou evidovány u vedoucího této laboratoře. Klíče jsou pak uloženy u ostrahy,

- celá budova, kde je laboratoř umístěna, je pod stálou fyzickou ostrahou, celý objekt je oplocen a je vybaven kamerovým systémem. Všechny dveře musí být mimo pracovní dobu uzamčeny. Laboratoř nemá okna, cirkulace vzduchu je zajišťována výhradně pomocí vzduchotechniky. Pro případ výpadku elektrického proudu je laboratoř vybavena záložním zdrojem energie (naftový generátor),
- do vlastní laboratoře, určené pro nakládání a skladování GMO 3. kategorie rizika, je vstup možný pouze přes vnější a dále vnitřní čistou šatnu. U vstupních dveří do laboratoře je umístěná kontrolka potvrzující správnou funkci vzduchotechniky (a tím i snížení tlaku v laboratoři vzhledem k tlaku v bezprostředním okolí). Výstup z laboratoře je možný výhradně přes hygienickou smyčku a dále vnitřní nečistou šatnu zpět do šatny vnější. Jednotlivé místnosti tohoto prostoru jsou odděleny uzavíratelnými plnými dveřmi. Veškeré rozvody jsou neprodyšně utěsněny,
- laboratoř určená pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika je rovněž určená pro nakládání s vysoce rizikovými agens (3. kategorie rizika, BSL3, ne-GMO),
- tato laboratoř je vybavena veškerou přístrojovou technikou potřebnou pro pracovní postupy v rámci prováděných výzkumných projektů v souladu s předpisy pro uzavřené nakládání s GMO 3. kategorie rizika (laminární flowbox třída II typ A2, germicidní UV-lampy, inkubátory, lednice, mrazák, temperovaná třepačka a inkubátor, centrifugy s uzavíratelnými kyvetami a ochranou před vznikem infekčního aerosolu, autokláv, zdroj deionizované vody a další obecné pomůcky, např. pipety). Je-li to možné, používají pracovníci jednorázový materiál (špičky, zkumavky, sérologické pipety apod.), které jsou předepsaným způsobem dekontaminovány a likvidovány,
- práce v laboratoři podléhá bezpečnostním předpisům uvedeným v příslušném provozním řádu a havarijním plánu,
- všichni pracovníci, kteří pracují s GMO, musí být před započatím práce proškoleni odborným poradcem, a to 1x ročně. V rámci tohoto školení jsou pracovníci poučeni o zásadách práce s GMO, s příslušnou legislativou, novými poznatky

- v oblasti nakládání s GMO, s provozním řádem a havarijním plánem. Noví pracovníci jsou proškolení bezprostředně před zahájením nakládání s GMO,
- veškerá manipulace s živým GMO je prováděna výhradně v boxu s laminárním prouděním třídy Biohazard s recirkulací a sterilní filtrací proudícího vzduchu a následnou sterilizací boxu UV zářením. Mimo prostor laboratoře se živá GMO nesmí vynášet, veškerý odpad je před vynesetím dekontaminován schválenými dezinfekčními prostředky a autoklávováním. Pravidelně se pak provádí kontroly účinnosti dekontaminace,
 - zvířata ani rostliny v prostorách MBL-BSL3 nesmí být přítomny,
 - do laboratoře pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika smí řádně oblečený pracovník vstoupit pouze, pokud svítí zelená kontrolka potvrzující správnou funkci vzduchotechniky. Červeně svítící kontrolka dává na vědomí, že zařízení vzduchotechniky nefunguje správně! V takovém případě pracovník opustí tyto prostory a závadu nahlásí vedoucímu laboratoře či jeho zástupci. V případě svítících germicidních lamp v prostoru laboratoře je vstup také zakázán,
 - termín a přesná specifikace práce v laboratoři (protokol) musí být předem předloženy vedoucímu laboratoře, případně určenému zástupci,
 - nový laboratorní materiál je přinášén pracovníky přes prokládací okno mezi laboratoří a místností „vzorkovna“,
 - před vstupem do komplexu se pracovník zapíše do evidenční knihy pohybu, vchází do šatny vnější, zavře za sebou dveře a aktivuje výstražné světlo „NEVSTUPOVAT“. Poté se svlékne z běžného laboratorního oblečení do spodního prádla,
 - pracovník přechází do vnitřní čisté šatny, kde si oblékne laboratorní oblečení určené pro práci v laboratoři pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika,
 - po vstupu do laboratoře, před započatím vlastní práce musí pracovník zkontrolovat funkčnost a stav veškerého zařízení včetně autoklávu, přítomnost potřebných dezinfekčních prostředků a dalšího materiálu potřebného k případné dekontaminaci,
 - práce ve flow-boxu musí být vykonávána s maximální pečlivostí s ohledem na minimalizaci rizika kontaminace (potřísněním, vylitím, vytvářením aerosolů) a porušení laminárního proudění (rozestavení materiálu musí být rovnoměrné, ve flow boxu nesmí být přítomny nadbytečné věci, pohyby nesmí být zbrklé a rychlé),

- k práci v laboratoři jsou určeny samostatné oděvy a obuv, které se mimo prostory nevynášejí. K ochranným pomůckám patří overaly, rukavice a jednorázové ústenky či obličejové masky a návleky na obuv. Dekontaminace použitého materiálu probíhá inaktivací v parním autoklávu. Prostor laboratoře se po ukončení práce dekontaminuje germicidními UV-lampami a pravidelně také suchými mlhami dezinfekčního prostředku STERUSIL®, generovanými přístrojem STERINIS®. Pro případ výpadku elektrického proudu je laboratoř vybavena záložním zdrojem energie (naftový generátor),
- GMO se z flowboxu smí vynést pouze ve vhodné uzavřené nádobě a před vyndáním z flowboxu musí být nádoba otřena schváleným dezinfekčním prostředkem,
- po ukončení práce ve flow boxu musí být veškeré vnitřní povrchy otřeny dezinfekčním prostředkem, který nemá korozivní vlastnosti (např. ethanol 75%). Poté je flow-box uzavřen a vnitřní pracovní plocha boxu sterilizována UV zářením. UV záření je ve flow boxu nastaveno na 30 minut,
- poté pracovníci otřou veškeré povrchy stolů, přístrojů včetně tlačítek jednorázovou utěrkou se schválenou dezinfekcí (SAVO 1,5 %). Utěrka je pak odstraněna do autoklávodatelného pytle,
- při odchodu z laboratoře odloží pracovník vnější ochranné rukavice do autoklávodatelného pytle umístěného v biohazard odpadovém koši. Tento pak z koše vyndá a vloží do autoklávu. Povrch prvního páru rukavic si omyje nejdříve dezinfekcí (ethanol 75 %) a poté vodou a mýdlem,
- po příchodu do hygienické smyčky odloží pracovní oděv a jednorázové ochranné prostředky do určených pytlů,
- poté pracovník přejde do vnitřní nečisté šatny, kde stiskem spínače vypne osvětlení v laboratoři a dále aktivuje UV germicidní lampy (svítí po dobu 30 minut v prostoru laboratoře i hygienické smyčky). Ve vnitřní nečisté šatně si pracovník umyje ruce, popřípadě se osprchuje a vejde do šatny vnější, kde se opět obleče do běžně užívaného bílého laboratorního oděvu, deaktivuje výstrahu „NEVSTUPOVAT“ a komplex opustí,
- v závislosti na čase potřebném pro sterilizaci materiálu autokláfováním a povrchů UV zářením (minimálně cca 1,5 h), vchází do laboratoře pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika pracovník oblečen v jednorázovém laboratorním oblečení, v botách určených pro práci v laboratoři, rukavicích a návlecích a vloží dekontaminovaný odpadový materiál do prokládacího okna. Poté prochází do prostoru hygienické smyčky, kde vlije 0,1 l vody do pytlů s použitým oblečením

a tyto pytle připraví k dekontaminaci. Dále pracovník vloží do autoklávu zbylý rizikový materiál a spustí dekontaminační proces. Oblečení může být autoklávováno společně s rizikovým materiálem v programu dekontaminace s filtrem. Po vykonání této procedury si laboratorní pracovník omyje ruce 75% ethanolem a poté vodou a mýdlem. Pak opouští prostor laboratoře a prochází hygienickou smyčkou, kde si sundá návleky, rukavice a jednorázový pracovní oděv. Přejde na konec hygienické smyčky, kde dezinfekcí ošetří boty, které zde zůstaly po předešlých pracovnících,

- odpadní voda z umyvadla a autoklávu je svedena do sběrné jímky (pod podlahou laboratoře), po zaplnění je obsah přečerpán do chlorační nádrže umístěné v hygienické smyčce. Chlorační nádrž je vybavena indikátorem naplnění nádrže a automatickým dávkovačem kontaminačního přípravku (Savo),
- je zakázáno jíst, pít, kouřit, používat mobilní telefony, osobní léky, aplikovat si kontaktní čočky nebo kosmetické prostředky, nosit osobní věci (hodinky, šperky) v prostorách komplexu. V případě podezření na potřísnění pokožky nebo oděvu se postupuje podle havarijního plánu.
- z laboratoře pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika nesmí být před úplnou sterilizací (autoklávováním, účinným dezinfekčním prostředkem či UV zářením) nic vynášeno,
- pracovat v laboratoři pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika smí pouze pracovník v náležitém oděvu a s ochrannými pomůckami určenými pouze pro tyto prostory: čistý pracovní oděv (košile kalhoty, ponožky), jednorázová filtrační polomaska (nebo celoobličejová s filtračně ventilační jednotkou), pracovní obuv, ochranný jednorázový overal, ochranné jednorázové návleky na obuv, ochranné rukavice,
- GMO budou kultivovány na pevných a tekutých půdách v objemech 15 - 30 ml média na jednu Petriho misku a 50 - 1000 ml tekutého média při kultivaci bakterií v Erlenmayerových baňkách. Přibližný odhad objemu tekutých kultur kmenů *Francisella tularensis* bude ročně asi 10-15 litrů za rok. Přesná množství kultivovaných GMO za daný rok budou vždy uvedeny v pravidelném ročním hlášení,
- základní povinnosti pracovníků v případě požáru příp. jiné havárie (pokud to okolnosti umožní) jsou následující: ukončení práce s GMO tak, aby bylo zabráněno rozšíření GMO v nepřítomnosti a uzavřít prostor. V případě požáru nelze předpokládat přežití GMO, případnému rozšíření přeživších GMO lze zabránit asanací místa havárie dezinfekčními prostředky,

- pokud hrozí únik GMO v souvislosti s havárií, shromáždit všechny nádoby s GMO a odpady kontaminované GMO, řádně je označit a přesunout na bezpečné místo, kde budou uzavřeny, vyrozumět bezodkladně osobu odpovědnou či osobu jí pověřenou a dále v případě potřeby pokračovat ve vyrozumění dalších subjektů,
- asanační prostředky použitelné k likvidaci geneticky modifikovaných organismů a dekontaminaci zasaženého prostoru jsou chlornan sodný (SAVO), persteril (2%), Incidin (0,5%), ethanol 75%, Sterinis pro dekontaminaci prostoru laboratoře (vytváří aerosol z 5%-6% roztoku peroxidu vodíku s kationty stříbra), germicidní UV-lampy – umístěné v laminárním boxu a v laboratoři pro plošné ozáření, alikvoty jednotlivých prostředků pro běžné použití, jsou dle potřeby skladovány přímo v laboratoři a v hygienické smyčce, kterou se laboratoř opouští (dezinfekční sprcha, germicidní UV-lampa),
- dezinfekční prostředky jsou dále uloženy ve skladu ve vstupních prostorech komplexu a ve skladu v rámci komplexu,
- veškerý odpad v této laboratoři je považován za patogenní. Všechny použité materiály a materiál určený k likvidaci je dekontaminován schválenými dezinfekčními prostředky (SAVO, Persteril, Incidin, Ethanol 75%) a autoklávován ve vhodných uzavíratelných autoklávovatelných nádobách, odpad může laboratoř opustit až po dekontaminaci autoklávováním,
- s dekontaminovaným materiálem je dále nakládáno jako s odpadem kat.č. 18 01 03 (Odpady, na jejichž sběr a odstraňování jsou kladeny zvláštní požadavky s ohledem na prevenci infekce) dle vyhlášky č. 381/2001 Sb., zákona č. 185/2001 Sb., o odpadech, likvidovány specializovanou Umbrella s.r.o. Trutnov, podle uzavřené smlouvy,
- výměnu HEPA filtrů zajišťuje 2x ročně specializovaná firma (PrimaTech s.r.o.), použité HEPA filtry předává firmě I.T.A.Servisní s.r.o. k likvidaci (jako odpad kat.č. 18 01 03). Žádné plynné škodliviny a nebezpečné odpady při nakládání nevznikají,
- autoklávování patogenního odpadu provádí zaškolený pracovník dle manipulačního řádu v náležitém programu,
- plotny s bakteriemi a uzavřené jednorázové zkumavky se vkládají do připravených odpadových autoklávovatelných pytlů umístěných vedle flow-boxu, GMO kultury na pevných půdách a veškeré kontaminované odpady jsou inaktivovány sterilizací autoklávováním v plastových pytlích nebo uzavřených nádobách, v tekutých půdách jsou nejprve GMO dekontaminovány chemickým dezinfekčním prostředkem a následně v uzavřených nádobách autoklávovány,

- špičky, jehly, mikrozkravky a injekce se vkládají do uzavíratelných autoklávovatelných, pevných nádob, sérologické pipety, pipety podle Pasteura a materiál tomu podobný se po ošetření dezinfekcí vkládají do speciálních autoklávovatelných uzavíratelných boxů,
- veškeré vnitřní povrchy flow boxu (pracovní deska, pipety, krabice na špičky) musí být po ukončení práce otřeny nekorozivním dezinfekčním prostředkem (Ethanol 75%); poté je box uzavřen a dekontaminován UV zářením,
- další povrchy stolů, přístrojů včetně tlačítek jsou otřeny jednorázovou utěrkou se schválenou dezinfekcí, která je dekontaminována autoklávováním. Po opuštění prostor je laboratoř (i hygienická smyčka) dekontaminována UV zářením germicidních lamp a v pravidelných cyklech též přístrojem Sterinis. Je prováděna kontrola účinnosti zneškodnění GMO,
- veškerá dokumentace pro práci s GMO a evidence provozu laboratoře pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika je uložena na Fakultě vojenského zdravotnictví UO v Hradci Králové v prostorách před vstupem do prostor a je vedena v evidenčních knihách a provozních denících, u vedoucího pracovníka zodpovědného za provoz těchto prostor a u odborných poradců pro GMO nebo u vedoucího laboratoře,
- dokumenty zahrnují: 1/ evidenční kniha GMO 3. kategorie rizika (eviduje množství uskladněného GMO), 2/ kniha záznamů o manipulaci s GMO 3. kategorie rizika: do této knihy jsou pracovníci povinni zaznamenávat chronologicky jednotlivé experimenty s GMO s uvedením následujících údajů: datum nakládání, osoba (-y) provádějící nakládání, množství připraveného GMO materiálu (objem bakteriální kultury), označení experimentu – stručná charakteristika a popis experimentu (odkaz na standardní operační postup), popřípadě odkaz na podrobnější záznam experimentu v laboratorní dokumentaci pracovníkem, údaje o jakýchkoliv mimořádných událostech v průběhu experimentu a o jejich řešení s podpisem odpovědné osoby podle bodu e tohoto řádu či osoby jí pověřené, 3/ provozní deník pro zaznamenávání o provedených kontrolách o přítomnosti GMO v prostorách, 4/ kniha evidence pohybu osob, 5/ kniha evidence nehod, 6/ kniha evidence dekontaminačních cyklů parním sterilizátorem, 7/ kniha evidence vynášeného materiálu a 8/ kniha provedení dekontaminace,
- závěrečné zprávy a publikace budou uloženy u vedoucích příslušných pracovních skupin,
- pracovníci pověřeni údržbou zařízení provádějí úklid laboratoře a přilehlých prostor určenými dezinfekčními prostředky, které se obměňují v pravidelných intervalech. Způsobem na mokro pracovník stírá podlahy všech prostor, dále otírá stěny a umyvadlo. Pracovník musí být oblečen do jednorázového obleku a musí

být vybaven gumovými rukavicemi. Úklidové příslušenství je umístěno v prostoru šaten, v laboratoři a hygienické smyčce, a slouží jen pro úklid daných prostor,

- činnosti nezbytné pro provoz laboratoře pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika zabezpečuje pověřený laboratorní pracovník, který se stará o přítomnost veškerého užitého materiálu v laboratoři a doplňuje hygienické, čistící a dezinfekční prostředky, pracovní oděvy a jednorázové ochranné prostředky a odnáší roztríděný a ošetřený odpad na určená místa. Dále zajišťuje dekontaminaci prostor UV záření a/nebo pomocí přístroje STERINIS. Dále kontroluje a udržuje teploty v lednicích, mrazících boxech a termostatech, dekontaminaci sběrných pytlů v hygienické smyčce a obuvi, praní a sušení dekontaminovaného laboratorního oblečení. Tento pracovník musí být oděn do jednorázového obleku a musí být vybaven laboratorními rukavicemi,
- externí pracovníci provádějící servis a údržbu přístrojů umístěných v laboratoři jsou poučeni o práci v laboratoři a vybaveni stejnými ochrannými pomůckami jako běžní pracovníci včetně jednorázových návleků a jednorázového pláště. Náradí a výměnné pracovní díly jsou dezinfikovány vhodným přípravkem či sterilovány v parním autoklávu. Prostory laboratoře jsou před vstupem servisních pracovníků dekontaminovány pomocí suché mlhy dezinfekčního prostředku STERUSIL®, generované přístrojem STERINIS® (technický servis zajištěn firmou Unipro Alpha C.S. s.r.o., Praha).

Další podmínky nakládání stanovené podle § 5 odst. 10 zákona

- Univerzita obrany 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 obrany 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.

Účel nakládání

Účelem nakládání je výzkum v oblasti molekulárních mechanismů patogeneze intracelulární patogenní bakterie *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*.

Výsledné GMO budou použity pro funkční analýzy *Francisella tularensis* s cílem objasnit molekulární mechanismy patogeneze.

Jedná se o součást dlouhodobého projektu s cílem definovat nové, účinné a bezpečné profylaktické a terapeutické přístupy.

Další požadavky na označení

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

Místo uzavřeného nakládání

Prostory určené k nakládání s GMO 3. kategorie rizika: „Radioizotopické laboratoře Hradec Králové – budova pro zpracování radioaktivních látek (RIL)“ (vestavba, vstup zadní částí), dnes sídlo Katedry molekulární patologie a biologie (KMPB), mikrobiologická / molekulárně-genetická laboratoř, Fakulta vojenského zdravotnictví UO, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové. Tyto prostory se nacházejí ve vestavbě zadní části budovy. Provoz laboratoře pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika je oddělen od běžného provozu v budově.

Požadavky na monitoring a podávání zpráv o jeho výsledcích

Kontroly prostor a zařízení na přítomnost GMO budou prováděny odpovědným pracovníkem namátkově, minimálně 4x ročně pomocí povrchových stěrů sterilními vatovými tampóny a následné specifické kultivace. V případě nárůstu bude identifikace provedena pomocí selektivní PCR za použití specifických primerů. O každé kontrole bude proveden zápis do Provozního deníku kontroly GMO, uloženého u vedoucího laboratoře.

Kontaminace vzduchu bude sledována položením otevřené Petriho misky s McLeod agarem do místa s potencionálním rizikem úniku po dobu 15 minut, s následnou kultivací (37°C, 24 - 72 h). Pro kontrolu přítomnosti GMO nesoucího plazmidy se kultivace provádějí ve výše uvedených médiích s přidavkem příslušného antibiotika (kanamycin, 20 µg/ml). V případě nárůstu bude identifikace provedena pomocí selektivní PCR za použití specifických primerů. O každé kontrole bude proveden zápis do Provozního deníku kontroly GMO, uloženého u vedoucího laboratoře.

Dále je kontrola přítomnosti GMO prováděna v případě, dojde-li ke kontaminaci zařízení nebo povrchu, které by neměly s GMO přijít do přímého kontaktu a jsou již chemicky dekontaminovány (SAVO, Incidin, Persteril, ethanol 75%)

a UV zářením (germicidní lampy). Kontrolu provádí vždy pracovník, který nakládá s GMO. V případě zjištění výskytu GMO uvnitř uzavřeného prostoru nebo v případě havárie bude stejným způsobem provedena kontrola i vně uzavřeného prostoru.

Vně uzavřeného prostoru bude kontrola prováděna stejným způsobem, a to v případě, že bude zjištěn výskyt GMO uvnitř uzavřeného prostoru nebo v případě havárie. Kontrolu provádí vždy pracovník, který nakládá s GMO. Po ukončení asanace osoba zodpovědná za likvidaci havárie zajistí odběr nejméně 5 vzorků z různých míst asanovaných prostor a bude se testovat, zda se v těchto vzorcích GMO nacházejí. Pokud nejsou GMO ve vzorcích zjištěny, je asanace považována za úspěšnou. Veškerý použitý materiál (včetně oděvu a ochranných pomůcek) a odpad je dekontaminován aplikací dezinfekčních prostředků a/nebo autoklárováním.

Doba platnosti povolení

Doba nakládání s GMO je od doby nabytí právní moci rozhodnutí MŽP do konce roku 2028 (10 let).

O d ů v o d n ě n í

Dne 10. ledna 2018 byla doručena na MŽP žádost Univerzity obrany o udělení povolení pro uzavřené nakládání ve třetí kategorii rizika s geneticky modifikovanými kmeny bakterie *F. tularensis* subsp. *tularensis* na pracovišti FVZ Hradec Králové. Tato žádost byla evidována pod č.j. MZP/2018/750/71.

Univerzitě obrany v Hradci Králové bylo zasláno potvrzení o přijetí žádosti dne 12. ledna 2018.

Ministerstvo životního prostředí posoudilo uvedenou žádost a dne 16. ledna 2018 ji podle § 5 odst. 4 zákona zaslalo k vyjádření Ministerstvu zdravotnictví, Ministerstvu zemědělství a Královéhradeckému kraji. 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.

Dne 7. února 2018 vydala své stanovisko k žádosti ČK GMO. Ve svém stanovisku uvedla, že je nutné z formálního hlediska v „žádosti“ doplnit datum podání, podpis druhé odborné poradkyně, ve všech částech a přílohách žádosti uvádět platnou citaci zákona či vyhlášky, popsat, zda a jak je dosaženo snížení tlaku v laboratoři vzhledem k tlaku v bezprostředním okolí, upravit a doplnit plánek

místností, pater a areálu, ve všech dokumentech sjednotit a doplnit označení místností, pro označení nepoužívat pro označení BSL3, dokument „hodnocení rizika“ by měl být nadepsán dle platné vyhlášky, v úvodu „žádosti“ doplnit tabulku shrnující informace o GMO, stručně popsat, jak lze rozeznat, že k infekci došlo (příznaky), jaké následky může způsobit infekce studovaným patogenem, a jak lze případné onemocnění léčit a na závěr doplnit výsledné hodnocení rizika nakládání. Z věcného hlediska je třeba v žádosti doplnit třídu a typ flowboxu a informaci o jeho preventivní údržbě a pravidelné kvalifikaci a informaci o údržbě a výměně HEPA filtrů a způsobu jejich likvidace, ve srovnávací tabulce uvést, jak konkrétně je daný požadavek splněn, v havarijním plánu je třeba zahrnout do hlášení případné havárie i orgány veterinární správy a doplnit podrobný postup v případě havárie, doplnit, že s uvedenými GMO bude nakládáno pouze na pracovišti žadatele v laboratoři pro nakládání s GMO 3. kategorie rizika a vývoz GMO se nepředpokládá, pro jednoznačný popis pravidel práce v laboratoři určené pro nakládání s GMO ve třetí kategorii rizika uvádět pouze jeden provozní řád, popsat, jakou detekční metodou se odliší původní kmen *Francisella tularensis* od GMO *Francisella tularensis* a jaký je rozdíl mezi těmito dvěma kmeny, doplnit podmínky specifické kultivace při provádění kontrol výskytu geneticky modifikovaných organismů, zprehlednit a zpřesnit údaje o příjemci, dárci a rodičovském organismu, v žádosti přepracovat popis používaných organismů, který je chybně uveden ve všech tabulkách a opravit i údaje o genetické modifikaci, aby bylo jasné, kterých GMO se popis týká.

Ministerstvo zdravotnictví podáním doručeným MŽP dne 15. února 2018 uvedlo, že k uvedené žádosti nemá připomínek.

Na základě nedostatků zjištěných v žádosti byla Univerzita obrany vyzvána dne 22. února 2018 k jejich odstranění dle zaslaných připomínek a zároveň bylo vydáno usnesení o přerušení řízení do doby odstranění vad podané žádosti, nejpozději do 30 dnů ode dne doručení usnesení.

MŽP dne 26. března 2018 obdrželo žádost upravenou dle zaslaných připomínek a konstatovalo, že připomínky a doporučení odborných posuzovatelů na doplnění byly akceptovány.

MŽP dne 10. dubna 2018 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 27. dubna 2018 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 (nakládání s geneticky modifikovanými kmeny bakterie *F. tularensis* subsp. *tularensis* na pracovišti UO FVZ Hradec Králové), 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 (s geneticky modifikovanými kmeny bakterie *F. tularensis* subsp. *tularensis* na pracovišti UO FVZ Hradec Králové).

..

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 obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra molekulární patologie a biologie, se sídlem Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové

B. Na vědomí:

1. Ministerstvo zdravotnictví
2. Ministerstvo zemědělství
3. Královéhradecký kraj