

//

Praha dne 12. srpna 2024
Č. j.: MZP/2024/750/2943
Sp. zn.: ZN/MZP/2024/750/160

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. 9 zákona ve věci žádosti Univerzity obrany, Vojenské lékařské fakulty, se sídlem Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, IČ: 601 62 694, týkající se uzavřeného nakládání ve třetí kategorii rizika s geneticky modifikovanými kmeny bakterie *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* na pracovišti Katedry molekulární patologie a biologie Vojenské lékařské fakulty, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové (Vaše č.j. MO 416047/2024-2994 HK), takto:

Univerzitě obrany, Vojenské lékařské fakultě

se sídlem 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

Univerzita obrany, Vojenská lékařská fakulta, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, IČ: 601 62 694

Specifikace geneticky modifikovaného organismu

Geneticky modifikované bakterie *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* kmen Schu je biologickým činitelem kategorie rizika 3. Tento kmen gramnegativní, fakultativně intracelulární bakterie *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*, kmen Schu, pochází ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, Brno, číslo kmene CAPM5600, izolováno z člověka, Ohio, USA. Připraveny budou jednak kmeny s deletovanými geny pro proteiny vybranými na základě předchozích analýz a kmeny se zpětně vloženými geny (komplementované) metodou in trans a příslušnými komplementovanými mutantními kmeny připravenými metodou in trans.

Seznam GMO 3. kategorie rizika:

F. tularensis Schu ΔFTT RS08150
F. tularensis Schu ΔFTT1766
F. tularensis Schu ΔFTT0912c
F. tularensis Schu ΔFTT0463
F. tularensis Schu ΔFTT1171c
F. tularensis Schu ΔFTT0469
F. tularensis Schu ΔFTT0169
F. tularensis Schu ΔFTT1296
F. tularensis Schu ΔFTT0683c
F. tularensis Schu ΔFTT RS08150 (pKK289Km::FTT RS08150)
F. tularensis Schu ΔFTT1766 (pKK289Km::FTT1766)
F. tularensis Schu ΔFTT0912c (pKK289Km::FTT0912c)
F. tularensis Schu ΔFTT0463 (pKK289Km::FTT0463)
F. tularensis Schu ΔFTT1171c (pKK289Km::FTT1171c)
F. tularensis Schu ΔFTT0469 (pKK289Km::FTT0469)
F. tularensis Schu ΔFTT0169 (pKK289Km::FTT0169)
F. tularensis Schu ΔFTT1296 (pKK289Km::FTT1296)
F. tularensis Schu ΔFTT0683c (pKK289Km::FTT0683c)

Fenotypové charakteristiky GMO s odstraněnými geny FTT_RS08150, FTT_1766, FTT_0912c, FTT_0463, FTT_1171c, FTT_0469, FTT_0169, FTT-1296, nebo FTT_0683c nejsou známy a budou předmětem výzkumu. U komplementovaných GMO dojde navrácením genů pomocí pKK289GFP plazmidu k obnovení původního fenotypu. Komplementované kmeny tedy budou genotypově i fenotypově zcela identické s původním kmenem *F. tularensis* Schu.

Specifikace genetické modifikace

F. tularensis Schu ΔFTT RS08150 (pKK289Km::FTT RS08150), *F. tularensis* Schu ΔFTT1766 (pKK289Km::FTT1766), *F. tularensis* Schu ΔFTT0912c (pKK289Km::FTT0912c), *F. tularensis* Schu ΔFTT0463 (pKK289Km::FTT0463), *F. tularensis* Schu ΔFTT1171c (pKK289Km::FTT1171c), *F. tularensis* Schu ΔFTT0469 (pKK289Km::FTT0469), *F. tularensis* Schu ΔFTT0169 (pKK289Km::FTT0169), *F. tularensis* Schu ΔFTT1296 (pKK289Km::FTT1296) a *F. tularensis* Schu ΔFTT0683c (pKK289Km::FTT0683c): GMO připravené komplementací in trans lze jednoznačně identifikovat kultivací v růstovém médiu za přítomnosti kanamycinu a následným

ověřením na přítomnost genů FTT_RS08150, FTT_1766, FTT_0912c, FTT_0463, FTT_1171c, FTT_0469, FTT_0169, FTT_1296, FTT_0683c použitím specifických primerů.

Výsledné GMO budou získány vynětím části dědičného materiálu. U *F. tularensis* Schu ΔFTT RS08150, *F. tularensis* Schu ΔFTT1766, *F. tularensis* Schu ΔFTT0912c, *F. tularensis* Schu ΔFTT0463, *F. tularensis* Schu ΔFTT1171c, *F. tularensis* Schu ΔFTT0469, *F. tularensis* Schu ΔFTT0169, *F. tularensis* Schu ΔFTT1296 a *F. tularensis* Schu ΔFTT0683c dojde k delecí genu FTT_RS08150, FTT_1766, FTT_0912c, FTT_0463, FTT_1171c, FTT_0469, FTT_0169, FTT_1296, FTT_0683c. Použitou metodou bude homologní rekombinace chromozomu s nereplikativním vektorem.

U *F. tularensis* Schu ΔFTT RS08150 (pKK289Km::FTT RS08150), *F. tularensis* Schu ΔFTT1766 (pKK289Km::FTT1766), *F. tularensis* Schu ΔFTT0912c (pKK289Km::FTT0912c), *F. tularensis* Schu ΔFTT0463 (pKK289Km::FTT0463), *F. tularensis* Schu ΔFTT1171c (pKK289Km::FTT1171c), *F. tularensis* Schu ΔFTT0469 (pKK289Km::FTT0469), *F. tularensis* Schu ΔFTT0169 (pKK289Km::FTT0169), *F. tularensis* Schu ΔFTT1296 (pKK289Km::FTT1296), *F. tularensis* Schu ΔFTT0683c (pKK289Km::FTT0683c) bude použitou metodou komplementace in trans.

Údaje o vektoru

Identita vektorů

pDM4: nereplikativní (sebevražedný) vektor pDM4 (Milton DL et al., J. Bacteriol. 178: 1310-1319) je odvozen od vektoru pDM1 a nese R6K replikační počátek, gen pro chloramfenikol acetyltransferázu – kódující rezistenci ke chloramfenikolu a gen sacBR z *Bacillus subtilis* pro sacharózovou selekci.

pKK289Km::GFP: replikativní vektor pKK289Km::GFP (Bonquist, L. et al., Infect. Immun. 76: 3502-10), který je odvozen od vektoru pKK214 (Norquist, A. et al., FEMS Immunol. Med. Microbio., 1996, 257-260) a navíc exprimuje Tn5-odvozený gen pro rezistenci ke kanamycinu. Gen gfp zůstává pod kontrolou promotoru pro GroES z *F. tularensis* LVS (Ericsson, M. et al., Infect. Immun., 1997, 65:1824-1829). Gen gfp je při vnesení genů FTT1075 nebo FTT1076 odstraněn.

Údaje o insertu

Insert se ve výsledném geneticky modifikovaném organismu nachází na volném plazmidu. U GMO *F. tularensis* Schu ΔFTT RS08150 (pKK289Km::FTT RS08150), *F. tularensis* Schu ΔFTT1766 (pKK289Km::FTT1766), *F. tularensis* Schu ΔFTT0912c (pKK289Km::FTT0912c), *F. tularensis* Schu ΔFTT0463 (pKK289Km::FTT0463), *F. tularensis* Schu ΔFTT1171c (pKK289Km::FTT1171c), *F. tularensis* Schu ΔFTT0469 (pKK289Km::FTT0469), *F. tularensis* Schu ΔFTT0169 (pKK289Km::FTT0169), *F. tularensis* Schu ΔFTT1296 (pKK289Km::FTT1296) a *F. tularensis* Schu ΔFTT0683c (pKK289Km::FTT0683c) bude součástí plazmidu pKK289Km.

Výsledky hodnocení rizika

Bakterie *Francisella tularensis* je původce onemocnění tularémie. Jedná se o vysoce virulentní typ bakterie, kdy k navození onemocnění stačí pouhých několik bakterií (10 CFU v případě *F. 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 pracoviště UO-VLF. Podstatná část výzkumu je zaměřena pouze na analýzu méně virulentních kmenů *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B). Nejvyšší riziko v případě zneužití však představují právě mnohem virulentnější kmeny *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A), jejichž výskyt je omezen na oblast severní Ameriky, v Evropě se nevyskytují. Výsledná vakcína by měla být účinná proti oběma typům. Zatím se však nepodařilo ani definovat původ rozdílné virulence u obou typů *F. tularensis*. Z tohoto důvodu je snaha více rozšířit výzkum i na kmeny typu A. Pro odhalení hlavní příčiny vysoké virulence je nezbytné připravit geneticky modifikované kmeny s deletovanými geny pro proteiny, které by mohly přispívat k fenotypovým rozdílům. Výsledná GMO pak budou sloužit k funkčním analýzám zaměřeným primárně na úlohu vybraných genů ve virulenci a patogenezi.

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.

U GMO *F. tularensis* Schu ΔFTT RS08150, *F. tularensis* Schu ΔFTT1766, *F. tularensis* Schu ΔFTT0912c, *F. tularensis* Schu ΔFTT0463, *F. tularensis* Schu ΔFTT1171c, *F. tularensis* Schu ΔFTT0469, *F. tularensis* Schu ΔFTT0169, *F. tularensis* Schu ΔFTT1296, resp. *F. tularensis* Schu ΔFTT0683c budou odstraněny geny FTT_RS08150, FTT_1766, FTT_0912c, FTT_0463, FTT_1171c, FTT_0469, FTT_0169, FTT-1296, nebo FTT_0683c, v případě ostatních GMO se jedná o komplementaci, tj. zpětné navrácení uvedených genů do příslušných delečních mutantů. Jiné genetické vlastnosti se nezmění. Fenotypové charakteristiky GMO s odstraněnými geny FTT_RS08150, FTT_1766, FTT_0912c, FTT_0463, FTT_1171c, FTT_0469, FTT_0169, FTT-1296, nebo FTT_0683c nejsou známy

a budou předmětem výzkumu. U komplementovaných GMO dojde navrácením genů pomocí pKK289GFP plazmidu k obnovení původního fenotypu. Komplementované kmeny tedy budou genotypově i fenotypově zcela identické s původním kmenem *F. tularensis* Schu.

Komplementované mutantní kmeny se od původního kmene svojí schopností přežívat nebudou lišit. V případě delečních mutantních kmenů bude schopnost přežívat experimentálně ověřována, je možné, že schopnost přežívání bude snižena. Toto experimentální ověření bude provedeno dvěma způsoby – (1) kultivací původního kmene a mutantních kmenů v růstovém médiu a porovnáním jejich růstu v čase, (2) porovnáním proliferační schopností mutantních kmenů s původním kmenem v buňkách hostitele (in vitro infekční model s využitím primárních myších makrofágů).

U delečních mutantních kmenů se nepředpokládá odlišnost, možná je omezená schopnost šíření v prostředí. U GMO, připravených komplementací in trans, představuje přítomnost plazmidu selekční nevýhodu a za nepřítomnosti příslušných antibiotik dojde k jeho ztrátě za vzniku původních delečních mutantních kmenů.

GMO připravené komplementací in trans jsou stabilní pouze v přítomnosti příslušných antibiotik, nepřítomnost vede ke ztrátě plazmidu za vzniku bakterie s delecí příslušných genů. GMO jsou patogenní, způsob a míra škodlivosti je identická s původním rodičovským organismem *F. tularensis* subsp. *tularensis* kmen Schu.

F. tularensis Schu ΔFTT RS08150, *F. tularensis* Schu ΔFTT1766, *F. tularensis* Schu ΔFTT0912c, *F. tularensis* Schu ΔFTT0463, *F. tularensis* Schu ΔFTT1171c, *F. tularensis* Schu ΔFTT0469, *F. tularensis* Schu ΔFTT0169, *F. tularensis* Schu ΔFTT1296, resp. *F. tularensis* Schu ΔFTT0683c: deleční GMO lze jednoznačně identifikovat pomocí specifické PCR. Primery 1F a 2R jsou navrženy tak, že jsou komplementární k sekvenci genu. Pokud gen chybí, primery nemůžou nasednout a nevzniká PCR produkt. Stejně primery lze použít pro ověření komplementace genu do příslušného delečního mutantního kmene. Pokud došlo ke komplementaci, vznikne PCR produkt.

F. tularensis Schu ΔFTT RS08150 (pKK289Km::FTT RS08150), *F. tularensis* Schu ΔFTT1766 (pKK289Km::FTT1766), *F. tularensis* Schu ΔFTT0912c (pKK289Km::FTT0912c), *F. tularensis* Schu ΔFTT0463 (pKK289Km::FTT0463), *F. tularensis* Schu ΔFTT1171c (pKK289Km::FTT1171c), *F. tularensis* Schu ΔFTT0469 (pKK289Km::FTT0469), *F. tularensis* Schu ΔFTT0169 (pKK289Km::FTT0169), *F. tularensis* Schu ΔFTT1296 (pKK289Km::FTT1296) a *F. tularensis* Schu ΔFTT0683c (pKK289Km::FTT0683c): GMO připravené komplementací in trans lze jednoznačně identifikovat kultivací v růstovém médiu za přítomnosti kanamycinu a následným ověřením na přítomnost genů FTT_RS08150, FTT_1766, FTT_0912c, FTT_0463, FTT_1171c, FTT_0469, FTT_0169, FTT_1296, FTT_0683c použitím výše uvedených primerů.

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/2024/750/1970 doručené na MŽP dne 22. května 2024, 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 opatřena technickými prostředky zamezujícími úniku GMO do prostředí a ohrožení zdraví osob, zvířat a druhové rozmanitosti, s následným úplným a bezpečným odstraněním připravených nebo použitých GMO,
- 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 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 určena 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 odstraněny,
- práce v laboratoři podléhá bezpečnostním předpisům uvedeným v příslušném provozním řádu a havarijním plánu,
- všichni pracovníci, kteří pracují s GMO, musí být před započítím 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 proškoleni 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,
- 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 запиše 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 započítím 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 autoklávovatelného pytle,
- při odchodu z laboratoře odloží pracovník vnější ochranné rukavice do autoklávovatelného 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 autoklávováním 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,
- 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 Petriho miskách a 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,

- veškerý použitý materiál a materiál určený k odstranění je dekontaminován schválenými dezinfekčními prostředky (SAVO, Persteril, Incidin, Ethanol 75%) a autoklávován ve vhodných uzavíratelných autoklávovatelných nádobách,
- dezinfekční prostředky jsou uloženy v prostorách laboratoře pro nakládání s GMO ve 3. kategorii rizika a ve skladu ve vstupních prostorech komplexu,
- veškerý odpad v této laboratoři je považován za patogenní. 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) - podle zákona č. 541/2020 Sb., Zákon o odpadech, ve znění pozdějších předpisů a příslušného prováděcího předpisu - vyhlášky č. 273/2021 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady, ve znění pozdějších předpisů a vyhlášky č. 8/2021 Sb., o Katalogu odpadů a posuzování vlastností odpadů (Katalog odpadů), ve znění pozdějších předpisů; odstraňování odpadů je zajištěno specializovanou Umbrella s.r.o. Trutnov, podle uzavřené smlouvy,
- výměnu HEPA filtrů provádí 2x ročně specializovaná firma (PrimaTech s.r.o.), použité HEPA filtry předává firmě I.T.A. Servisní s.r.o. k odstranění (jako odpad kat.č. 18 01 03),
- 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, mikrozkušavky 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 Vojenské lékařské fakultě 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/ 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
 - 2/ provozní deník pro zaznamenávání o provedených kontrolách o přítomnosti GMO v prostorách
 - 3/ kniha evidence pohybu osob
 - 4/ kniha evidence nehod
 - 5/ kniha evidence dekontaminačních cyklů parním sterilizátorem
 - 6/ kniha evidence vynášeného materiálu
 - 7/ kniha provedení dekontaminace,
- pracovníci pověřeni údržbou zařízení provádějí úklid laboratoře a přilehlých prostor určenými dezinfekčními prostředky, které se obměňují v pravidelných intervalech. 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 užitného 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 dezinfekční prostředků a/nebo autoklávováním.

Doba platnosti povolení

Doba nakládání s GMO je od doby nabytí právní moci rozhodnutí MŽP do konce roku 2034 (10 let).

O d ů v o d n ě n í

Dne 22. května 2024 byla doručena na MŽP žádost od Univerzity obrany o udělení povolení pro uzavřené nakládání ve třetí kategorii rizika s geneticky modifikovanými

kmeny bakterie *F. tularensis* subsp. *tularensis* na pracovišti VLF Hradec Králové. Tato žádost byla evidována pod č.j. MŽP/2024/750/1970.

Univerzitě obrany v Hradci Králové bylo zasláno potvrzení o přijetí žádosti dne 23. května 2024.

Ministerstvo životního prostředí posoudilo uvedenou žádost a dne 23. května 2024 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 18. června 2024 vydala své stanovisko k žádosti ČK GMO. Ve svém stanovisku uvedla připomínky na formální úpravu žádosti, doplnění informací do srovnávací tabulky pracoviště, části meziprodukt nakládání a do provozního řádu.

Ministerstvo zdravotnictví podáním doručeným na MŽP dne 16. srpna 2023 upozornilo na revizi již neplatného názvu fakulty v dokumentech a používání správné terminologie v souladu se zákonem č. 541/2020 Sb., o odpadech, v platném znění.

Na základě nedostatků zjištěných v žádosti byla Univerzita obrany vyzvána dne 24. června 2024 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 8. července 2024 obdrželo opravu žádosti dle zaslaných připomínek a po jejím posouzení ČK GMO konstatovalo, že připomínky a doporučení odborných posuzovatelů na doplnění byly akceptovány.

MŽP dne 23. července 2024 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. srpna 2024 žadatel požadovanou částku uhradil.

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 ČR 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. Alexandra Skopcová

ředitelka odboru environmentálních rizik a ekologických škod

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 po nabytí právní moci:

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