

**Havarijní plán ÚOCHB AV ČR v.v. i. pro práci s geneticky
modifikovanými organismy,
pro Obor biochemie a molekulární biologie^a, skupinu Biochemická
farmakologie^b, skupinu Strukturní biologie^c a skupinu Vyléčení hepatitidy B^d
dle § 9 Vyhlášky 209/2004**

a) Adresa pracoviště

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.
Flemingovo nám. 542/2, Praha 6, 160 00
IČO 61388963
DIČ 006-61388963
Jméno, příjmení a trvalý pobyt ředitele ústavu:
RNDr. PhDr. Zdeněk Hostomský, CSc,
bydliště: **Bruselská 183/16, Praha 2**
telefon: **220 183 333**
E-mail: **uochb@uochb.cas.cz**

**Jméno, příjmení, adresa bydliště, telefonní číslo, číslo faxu a adresu elektronické pošty
odborného poradce**

RNDr. Milan Kožíšek, Ph.D.
bydliště: **Vrší 393/3, 182 00 Praha 8 - Kobylisy**
kontaktní adresa: **Flemingovo nám. 542/2, Praha 6, 160 00**
telefon: **220 183 518**
E-mail: **milan.kozisek@uochb.cas.cz**

osoby odpovědné za likvidaci havárie

^aElena Dolejší

bydliště: Sadová 1581, Říčany, 251 01
kont. adresa: Flemingovo n.2, Praha 6, 160 00
telefon: 220 183 532
E-mail: **elena.dolejsi@uochb.cas.cz**

^aIng. Karolína Šrámková

bydliště: Dobřejovická 570, Praha 4, 142 00
kont. adresa: Flemingovo n.2, Praha 6, 160 00
telefon: 220 183 452
E-mail: **karolina.sramkova@uochb.cas.cz**

^aMgr. Jan Weber, CSc.

bydliště: Levínský vršek 161, Králův Dvůr, 267 01
kont. adresa: Flemingovo n.2, Praha 6, 160 00
telefon: 220 183 420
E-mail: **jan.weber@uochb.cas.cz**

^bDr. rer. nat., Mgr. Martin Zavřel

bydliště: Fügnerova 1568, Louny, 440 01
kont. adresa: Flemingovo n.2, Praha 6, 160 00
telefon: 220 183 502
E-mail: **martin.zavrel@uochb.cas.cz**

^cIng. Irena Siegllová

bydliště: Frýdlantská 1297/4, Praha 8, 182 00
kont. adresa: Flemingovo n.2, Praha 6, 160 00
telefon: 220 183 537
E-mail: **irena.siegllova@uochb.cas.cz**

^dMgr. Gabriel Birkuš, CSc.

bydliště: Pod Harfou 933/62, Praha 9, 190 00
kont. adresa: Flemingovo n.2, Praha 6, 160 00
telefon: 220 183 112
E-mail: **gabriel.birkus@uochb.cas.cz**

b) Přesné označení pozemků prostor a zařízení, v němž se s GMO nakládá

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Flemingovo náměstí 542/2, Praha 6, 160 00

Obec: Praha, městská část/obvod: Praha 6, katastrální území: Dejvice

parcelní čísla pozemků: 638/1, 641/2; číslo popisné stavebního objektu: 542

adresní místa: Flemingovo náměstí 542/2, Bechyňova 542/2, Stavitzská 542/1, Zelená 542/19

c) Plán pracoviště:

Obor biochemie a molekulární biologie, skupina Biochemická farmakologie, skupina Strukturní biologie a skupina Vyléčení hepatitidy B.

S GMO bakterií *Escherichia coli*, kvasinkami, bakuloviry a GMO savčími buňkami v kultuře se pracuje v laboratořích A.01.11, A.01.13, A.01.55, A.01.57, A.01.62, A.01.63, A.01.64, A.01.78, A.01.79, A.1.06, A.1.21, A.1.22, A.1.23, A.1.24, A.1.34, A.1.47, A.2.28a, A.2.28b, A.2.29, A.2.48, A.2.92a, A.2.97 v budově A a v laboratořích C.1.03, C.1.04, C.1.05, C.1.06, C.1.20, C.2.05, C.2.07, C.2.08, C.2.09, C.2.10, C.2.16, C.2.17, C.2.18, C.2.20, C.3.05, C.3.07, C.3.08, C.3.09, C.3.10, C.3.16, C.3.17, C.3.18, C.3.20, C.4.05, C.4.07, C.4.08, C.4.09, C.4.10, C.4.16, C.4.17, C.4.18, C.4.20 v budově C.

Detailní plán prostor ÚOCHB AV ČR, v.v.i, kde dochází k nakládání s GMO, je přílohou 2.

d) Popis havárie, která může vzniknout v prostorách nebo místě, kde probíhá nakládání.

Havárie je závažný neplánovaný únik GMO mimo bariery. V takovém případě je třeba neprodleně učinit opatření k likvidaci havárie.

Každé nakládání s GMO je zařazeno do určitého typu rizika a posouzení havárie závisí na tomto typu rizika. V laboratořích ÚOCHB AV ČR, v.v.i. se nakládá s GMO první a druhé kategorie (Příloha 2). V případě nakládání s GMO 1. kategorie rizika při úniku GMO mimo bariery nebezpečí nehrozí a uniklé GMO je možno likvidovat postupem popsáním níže. V případě nakládání s GMO 2. kategorie rizika musí postup být podstatně důkladnější. Pokud není definováno, že dané nakládání patří do 1. kategorie rizika, je třeba s ním zacházet tak, jakoby patřilo do 2. kategorie rizika. Za havárie ve vlastním slova smyslu se nepovažují malé úniky GMO, při nichž uniklé GMO jsou spolehlivě zlikvidovány v rámci uzavřeného prostoru. Za havárii však je nutno považovat rozšíření GMO mimo prostory určených k uzavřenému nakládání s GMO.

V prostorách ÚOCHB pro uzavření nakládání s GMO mohou vzniknout tyto typy havárií:

1. Při rozlití většího objemu mikrobiální kultury, obsahující plasmidovou DNA: Zasažené místo je třeba s použitím ochranných rukavic vysušit, odpad zlikvidovat autoklávováním a místo ošetřit v dostatečném rozsahu dvěma typy desinfekčních roztoků: např. Ajatinem a následně chloraminem.
2. Únik mimo laboratoř v průběhu transportu materiálu z jednoho uzavřeného prostoru do druhého nebo z uzavřeného prostoru do prostoru sterilizace: Všechn materiál, který bude transportován mimo laboratoř, musí být neprodyšně uzavřen v plastových obalech (dvě vrstvy) a zajištěn proti otevření. Obaly musí mít značku Biohazard. Likvidace takového havárie probíhá stejně jako v předchozím případě.
3. Při rozbití skleněné či jiné kultivační nádoby s kulturami *in vitro*, obsahující transgenní kultury: Postup je stejný, jako v prvním případě. Riziko zde představují pouze bakterie, protože tkáňové kultury nejsou schopny přechodu do nesterilních podmínek a hynou. U asanace havárie s kulturou savčích buněk transformovaných virovým vektorem SV40 je vhodné detekovat zbytkovou přítomnost virové DNA na zasaženém pracovním povrchu PCR reakcí, viz níže sub f) a v příloze 1.

Po inaktivaci autoklávováním či dezinfekčními činidly (2% roztok chloraminu, SAVO nebo Ajatin) jsou odpady dále likvidovány jako odpad 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 185/2001 Sb. o odpadech, specializovanou firmou SITA Bohemia a.s. Při používaných metodách nakládání s GMO žádné nebezpečné plynné zplodiny nevznikají.

e) Přehled možných následků havárie na zdraví lidí, zvířat a životní prostředí a biologické rozmanitosti, včetně způsobů zjišťování těchto následků a účinné ochrany před nimi.

Vědecká práce na ÚOCHB AV ČR Praha se provádí výhradně s geny, u nichž je známo, že nemají nepříznivé následky na zdraví lidí či zvířat ani na biologickou diverzitu. Používají se selekční geny pro rezistenci k antibiotikům. Přesto však je nezbytné dodržovat zásady práce v infekčních laboratořích.

f) validované postupy detekce přítomnosti geneticky modifikovaných organismů

Základní metodou detekce transgenní DNA je amplifikace příslušného úseku s následnou sekvenací, PCR v přítomnosti specificky navrhovaných primerů, návod na detekci je uveden v příloze 1. Zasažené místo je nutno monitorovat mikrobiologickou kultivací a detekcí přítomnosti či nepřítomnosti vektorových plasmidů. V případě detekce vektorových plasmidů je nutno desinfekci provádět na větší ploše alternativním desinfekčním prostředkem.

g) validované metody a postupy, použitelné ke zneškodnění geneticky modifikovaných organismů nebo produktů a dekontaminaci uzavřeného prostoru.

V případě úniku geneticky modifikovaných mikroorganismů bude zasažený prostor ošetřen Ajatinem a následně chlornanem sodným. Po chemické asanaci se místnost ozáří germicidní lampou. Jednotlivé drobné předměty, které byly unikem zasaženy, budou autoklávovány. Monitoring asanovaných prostor bude prováděn postupy specifikovanými v bodě f a v příloze 1.

h) Metody pro izolaci prostor a zařízení zasažených havárií, včetně metod kontroly účinnosti izolace.

Havárie vyžadující izolaci prostor nepřichází v podmínkách ústavu v úvahu. Nepřítomnost geneticky modifikovaných mikroorganismů bude dokumentována odebráním vzorů bakterií z původně zasaženého místa a průkazem (pomocí PCR) nepřítomnosti některého z transgenů.

i) Popis a náskres uložení asanačních prostředků použitelných ke zneškodnění předmětných geneticky modifikovaných organismů nebo produktů a dekontaminaci zasaženého prostoru.

Asanační prostředky: 2 % roztok chlornanu sodného, SAVO, Ajatin.

Umístění: na označených místech ve všech prostorách povolených pro práci s GMO.

Náskres nepřiložen, neboť umístění je v různých místnostech rozdílné.

j) postupy na ochranu zdraví člověka a zvířat a ochranu životního prostředí v případě nežádoucího ovlivnění vzniklou havárií, případně metod na zneškodnění nebo sanaci rostlin a zvířat, které se nacházely v oblasti v době havárie, v souladu se zvláštními právními předpisy.

Netýká se.

k) popis postupu následného monitoringu prostor a pozemků po ukončení asanace

Nepřítomnost geneticky modifikovaných mikroorganismů bude monitorována odebráním vzorků bakterií z původně zasaženého místa a průkazem (pomocí PCR) nepřítomnosti některého z transgenů.

l) Obce, případně osoby, kterým je havarijní plán předkládán podle § 20 odst. 3 zákona

Kopie havarijního plánu bude předána podle § 20 odst. 3 zákona 78/2004 Sb.:

- Odboru dopravy a životního prostředí Městského úřadu Prahy 6 (příslušné obci, v jejíž katastrálním území nakládání s GMO probíhá)
- Odboru ochrany obyvatelstva a krizového řízení Hasičského záchranného sboru hlavního města Prahy (územně příslušnému hasičskému záchrannému sboru kraje)
- Odboru bezpečnosti Magistrátu hlavního města Prahy (krajskému úřadu)

m) Způsob vyrozumění správních orgánů uvedených v § 27 zákona v případě havárie, jakož i způsob varování občanů, v závislosti na místě havárie a jejich možných následcích.

V případě havárie budou informovány tyto instituce státní správy:

- Ministerstvo životního prostředí České republiky
- Ministerstvo zdravotnictví České republiky
- Česká inspekce životního prostředí

Součástí vyrozumění budou především informace o tom, jaký GMO unikl, množství, místo a následky-rizika pro zdraví člověka a zvířat, životní prostředí a biologickou rozmanitost a způsob jejich odstranění. Vyrozumění se bude dít e-mailem s následným písemným potvrzením. Varování občanů nebude prováděno.

n) vyjádření odborného poradce, jeho podpis a datum podpisu

S vypracovaným havarijním řádem souhlasím.

7. února 2022



RNDr. Milan Kožíšek, Ph.D.
odborný poradce pro nakládání s GMO

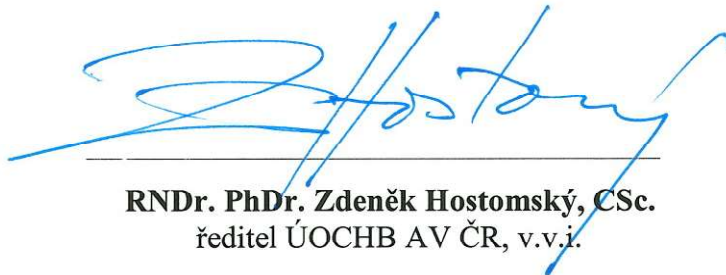
Tento havarijní plán ÚOCHB má charakter interního předpisu a vstupuje v platnost dnem jeho schválení ředitelem. Platí do odvolání učiněného ředitelem.

Zpracovala:

Schválil dne: 7. února 2022



Ing. Mária Čechová



RNDr. PhDr. Zdeněk Hostomský, CSc.
ředitel ÚOCHB AV ČR, v.v.i.

Přílohy:

1. Postup detekce přítomnosti geneticky modifikovaných organismů
2. Plány prostor pro nakládání s GMO v ÚOCHB AV ČR, v.v.i.

Příloha 1:

Postup detekce přítomnosti geneticky modifikovaných organismů

Zjišťování kontaminace vzduchu

Metoda slouží k monitorování úniku geneticky modifikovaných organismů (GMO) do prostoru. Tuto kontrolu se doporučuje provádět 1x za 6 měsíců, a dále po každé mimořádné události. Provádí se rozložením otevřených Petriho misek s agarovým médiem v uzavřeném prostoru práce s GMO. Půda v agarových miskách má být svým složením specifická pro testované mikroorganismy, s nimiž se pracuje a u kterých hrozí riziko úniku, s antibiotikem selektujícím GMO s plazmidem nesoucím genetickou modifikaci. Misky s agarovým médiem se otevřené položí do uzavřeného prostoru s potenciálním rizikem úniku. Po 15 minutách se opět přikryjí a nechají inkubovat v termostatu na 37 °C resp. 30 °C podle mikroorganismu po dobu 1-3 dnů. V případě nárůstu kolonií je třeba provést důkladnou dezinfekci ploch dezinfekčními prostředky.

V případě opakovaného nárůstu kolonií v prostoru, kde probíhá nakládání s GMO 2. kategorie rizika, je třeba vyloučit genetickou modifikaci mikrobiálních izolátů vzrostlých na Petriho miskách pomocí metody PCR s použitím příslušných primerů. V případě pozitivní PCR reakce je třeba dosáhnout účinné inaktivace a zneškodnění detekovaného GMO.

Zjišťování kontaminace povrchů stěrovou metodou

Metoda se provádí setřením sledovaného povrchu sterilní gázou a následným rozetřením stěru na Petriho misky s vhodným agarovým médiem (stejně jako při zjišťování kontaminace vzduchu). V případě nárůstu kolonií se postupuje stejně jako při zjišťování kontaminace vzduchu.

Též lze stěrem očkovat přímo živné LB médium s vhodným antibiotikem. Takto zaočkované médium se následně inkubuje při 37 °C přes noc za třepání v inkubátoru. Pokud naroste bakteriální suspenze, přítomnost GMO se provede pomocí PCR. V případě pozitivní PCR reakce je třeba provést důkladnou dezinfekci povrchu dezinfekčními prostředky.

Detekce GMO pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR)

Přítomnost GMO je zjišťována polymerázovou řetězovou reakcí s použitím specifických primerů odvozených ze sekvencí vložených insertů DNA.

Vzorový test přítomnosti modifikované DNAs využitím PCR:

Složení reakční směsi

Složka	Objem (μl)
sterilní voda	31
5x konc. pufr pro Phusion High-Fidelity DNA polymerasu	10
10 mM dNTP mix	1
DMSO	1,5
10 μM primer 1 pro detekci DNA GMO („forward primer“)	2,5
10 μM primer 2 pro detekci DNA GMO („reverse primer“)	2,5
Phusion High-Fidelity DNA polymerasa	0,5
suspenze testované kolonie ve sterilní vodě	1

Program automatického cykléru

- 1) 98°C/30 s
- 2) (98°C/10 s – 65°C/30 s – 72°C/90 s) opakování 30x
- 3) 72°C/8 min

Produkt PCR amplifikace se vizualizuje a zkoumá pomocí elektroforetické analýzy. Amplifikované úseky DNA lze dále přesně charakterizovat sekvenováním a porovnáváním se sekvencí předpokládaného modifikovaného úseku v GMO.

Příklad základních primerů pro detekci určitých GMO pomocí PCR:

Primery pro geny klonované do bakteriální vektorů:

T7 prom: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
T7 term: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'

Primery pro geny klonované do vektorů pro *Pichia pastoris*

5' AOX1: 5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'
3' AOX1: 5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'

Primery pro geny klonované do vektorů pro *Saccharomyces cerevisiae*:

Matchmaker 5'ADL: 5' CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC 3'
Matchmaker 3'ADL: 5' GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT 3'

Primery pro geny klonované do vektorů pro *Leishmania tarentolae* :

sat F: 5' CCTAGTATGAAGATTTTCGGTGATC 3'
ssu R: 5' CTGCAGGTTACCTACAGCTAC 3'

Primery pro geny klonované do bakulovirových vektorů:

Bac1: 5' AACCATCTCGCAAATAAATA 3'
Bac2: 5' ACGCACAGAATCTAGCGCTT 3'

Primery pro amplifikace DNA úseků klonovaných do vektoru SV40:

E1a-1 forw: 5' CCGAAGAAATGGCCGCCAGTC 3'
E1a-2 reverse: 5' GGACGCCGGGTAGGTCTTGC 3'

Použité postupy jsou dle následujících zdrojů:

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: V knize: Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1989)
Ruml T., Rumlová M., Pačes V: Genové inženýrství, VŠCHT Praha 2002
PCR protokol pro Phusion High-Fidelity DNA polymerasu dle protokolu dostupném on-line (produkt New England Biolabs, obj.č. M0530, www.neb.com)
E. Gendra et al.: A Sequence Motif in the Simian Virus 40 (SV40) Early Core Promoter Affects Alternative Splicing of Transcribed mRNA. J. Biol. Chem. 282, 11648-11657, 2007

Pozn. Po izolaci DNA z bakteriálních nebo kvasinkových buněk je možno zjistit, zda DNA obsahuje klonovaný fragment také restrikční analýzou, tj. specifickým štěpením DNA pomocí restrikčních endonukleas. Tato analýza však již není dnes rozšířená, je nahrazena daleko citlivější a specifitější detekcí pomocí PCR.

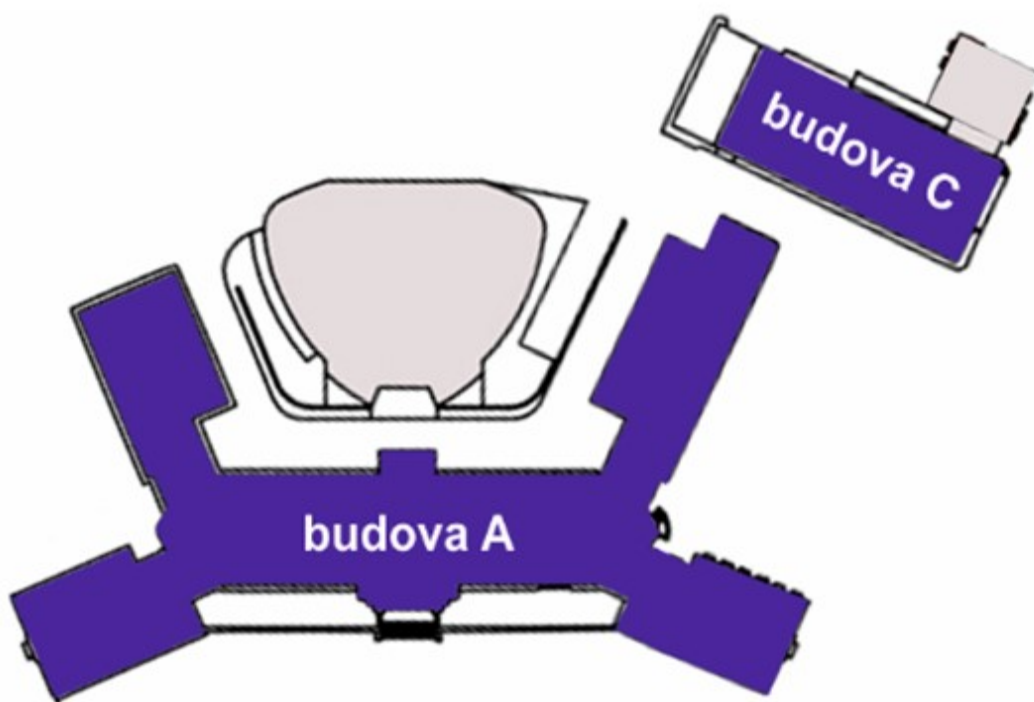
Příloha 2:

Plány prostor pro nakládání s GMO v ÚOCHB AV ČR, v.v.i.

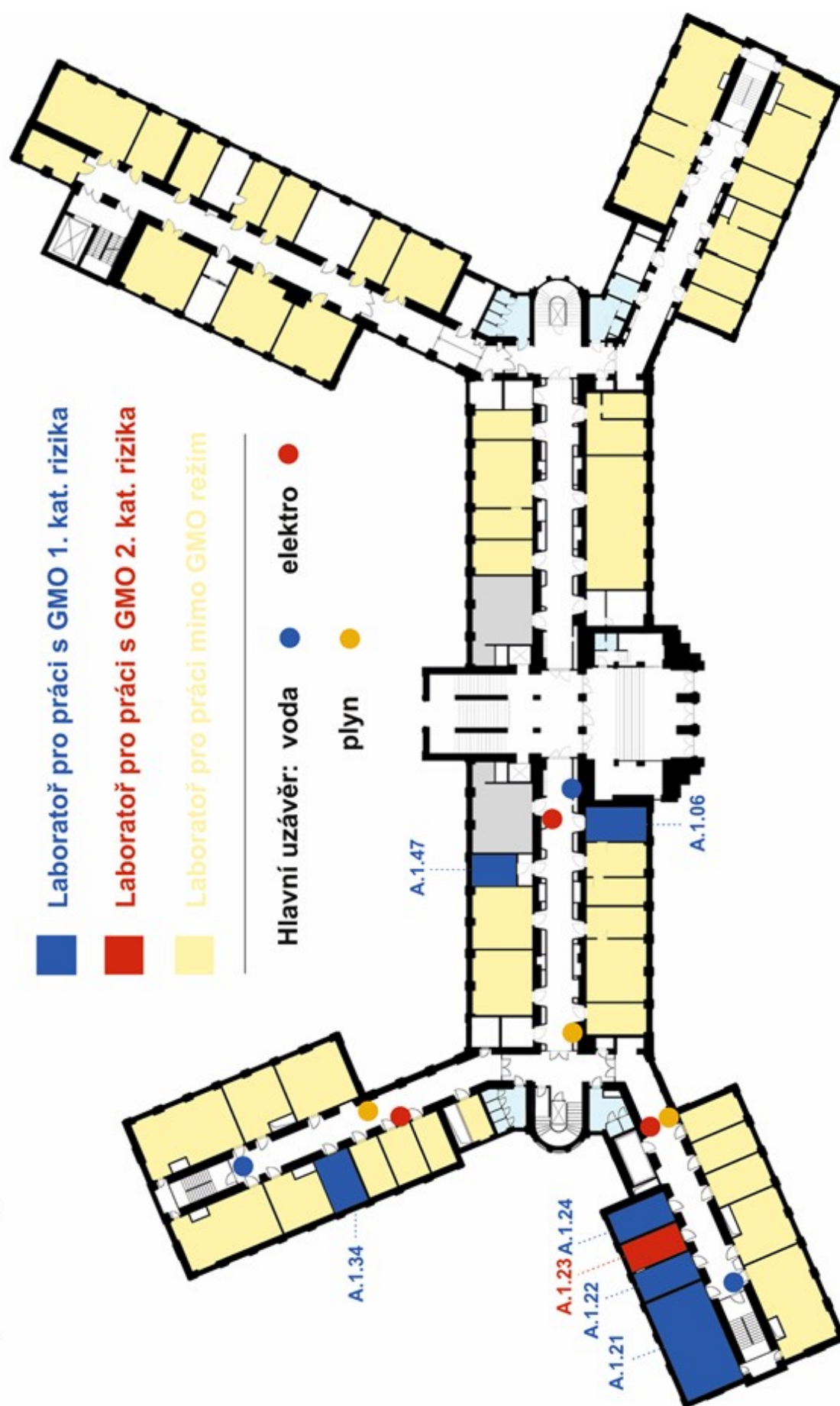
Letecký pohled na areál ÚOCHB AV ČR, v.v.i.:



Umístění budov s prostory pro nakládání s GMO (budovy A a C) v areálu:

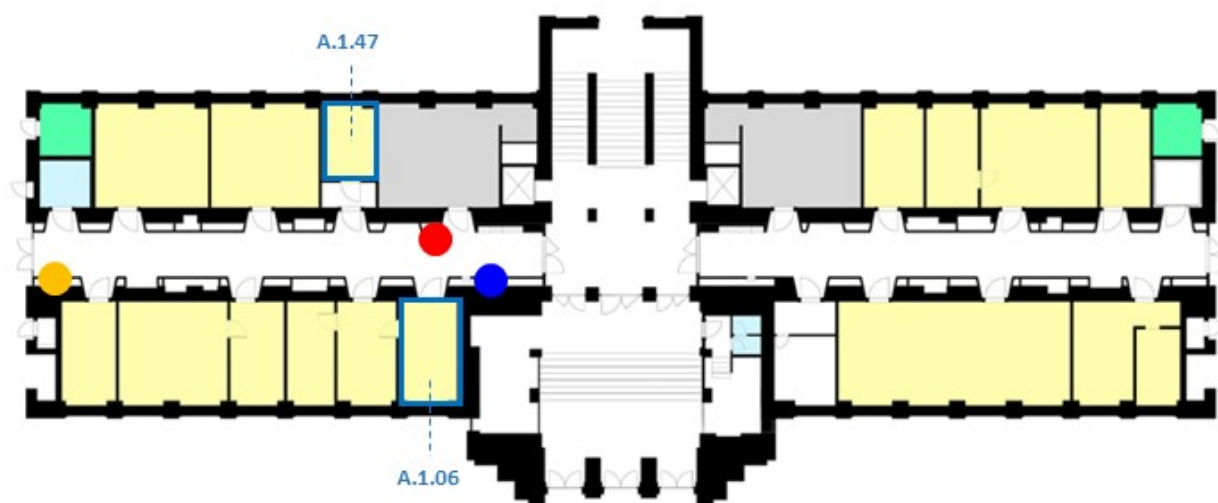


Plán prostor pro nakládání s GMO - budova A 1.NP

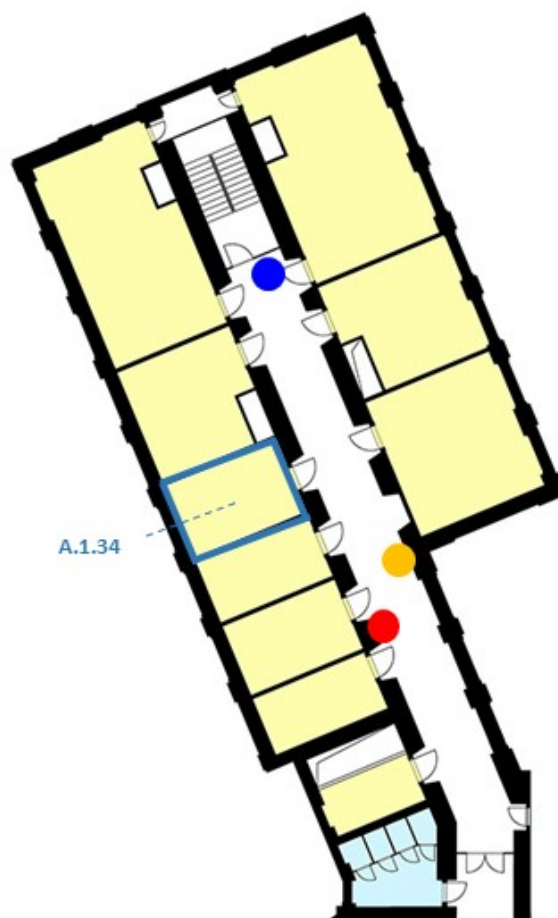


Detail půdorysů GMO laboratoří v budově A 1.NP

- středová část budovy A, 1.NP:



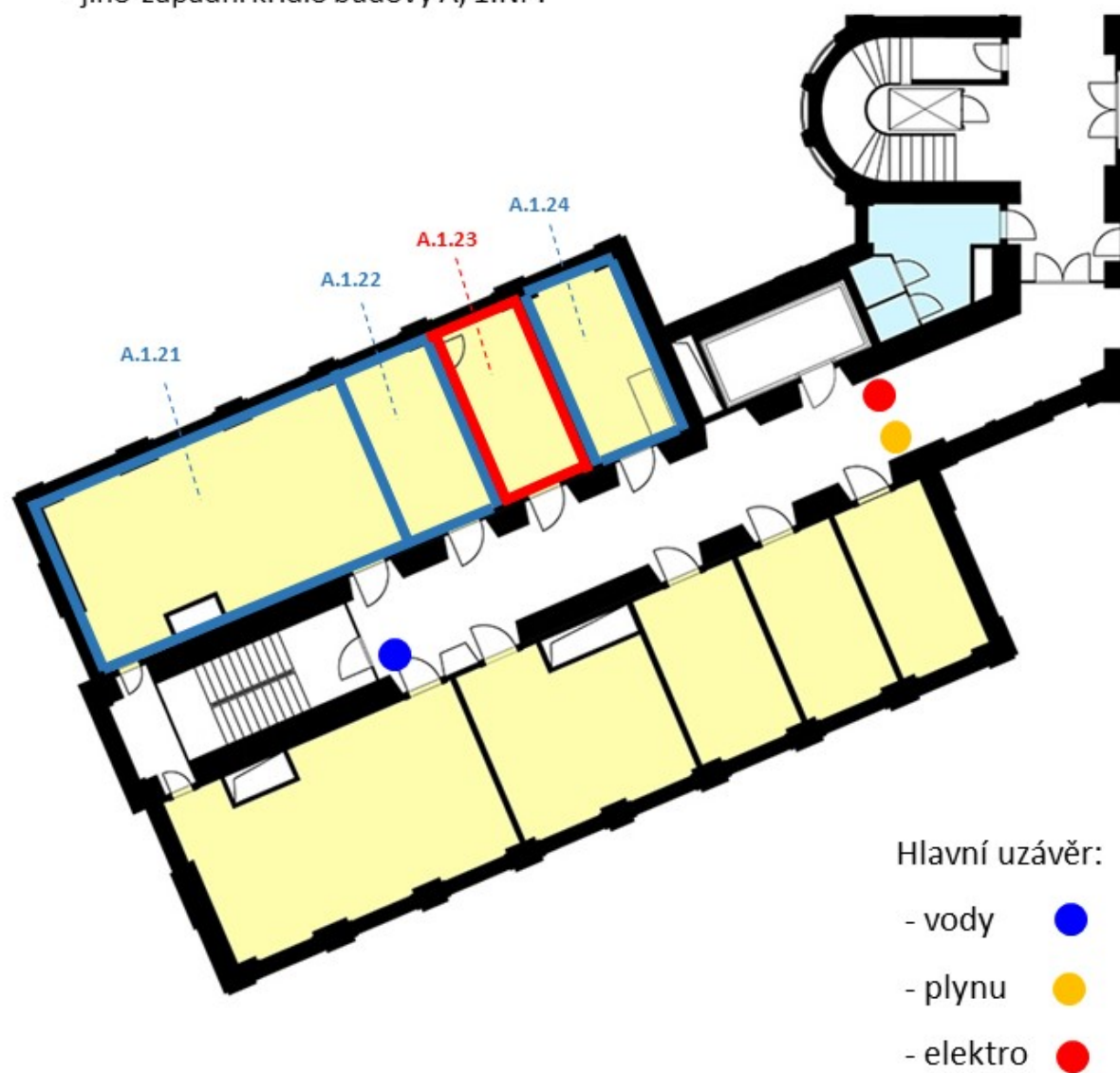
- severo-západní křídlo budovy A, 1.NP:



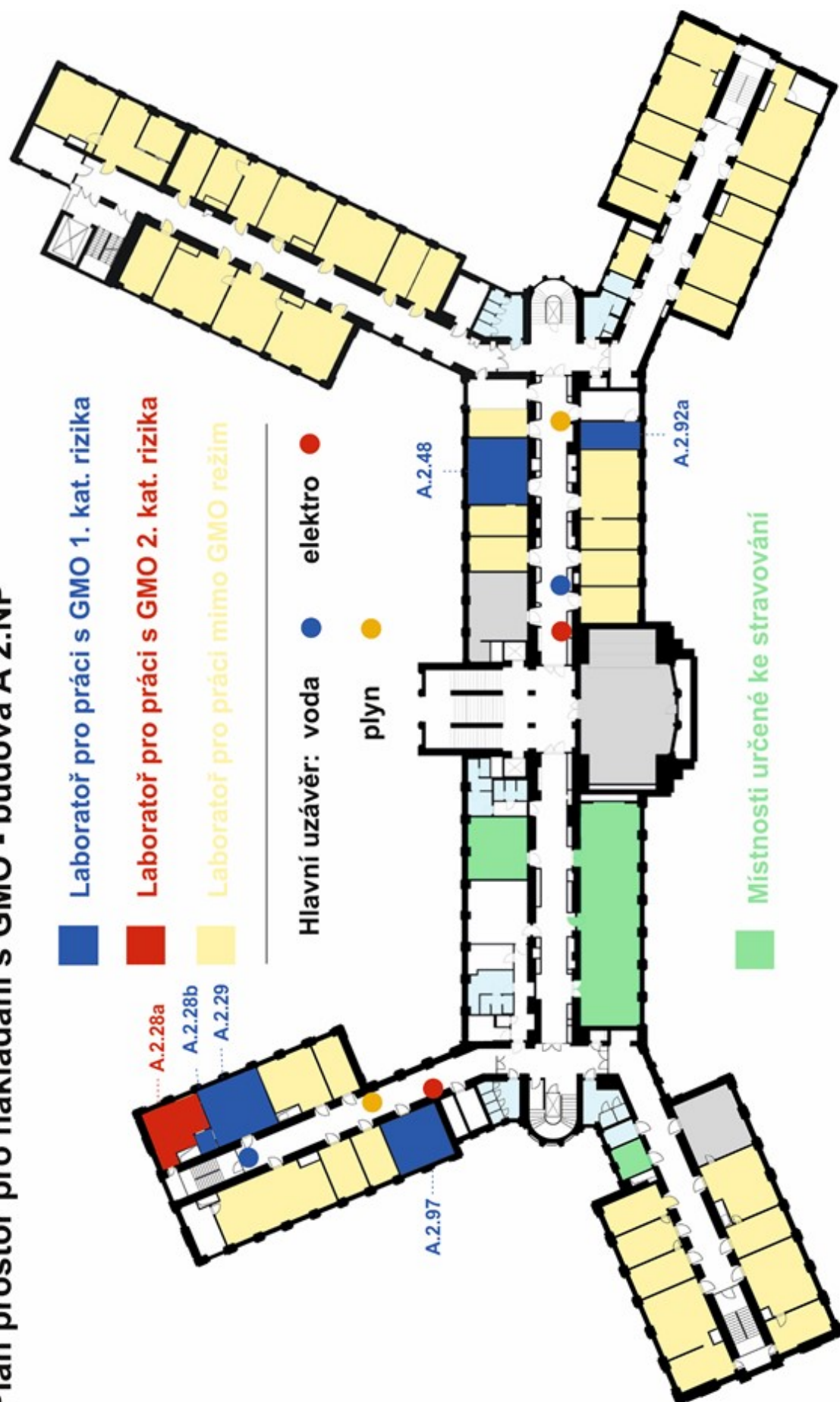
Hlavní uzávěři:

- vody ●
- plynu ●
- elektro ●

- jiho-západní křídlo budovy A, 1.NP:

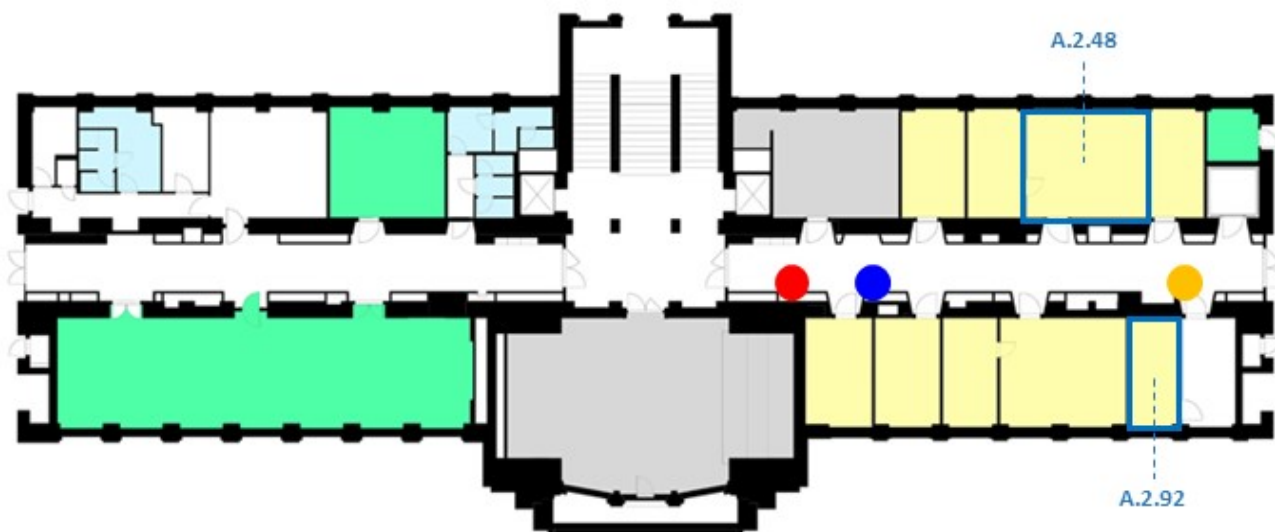


Plán prostor pro nakládání s GMO - budova A 2.NP

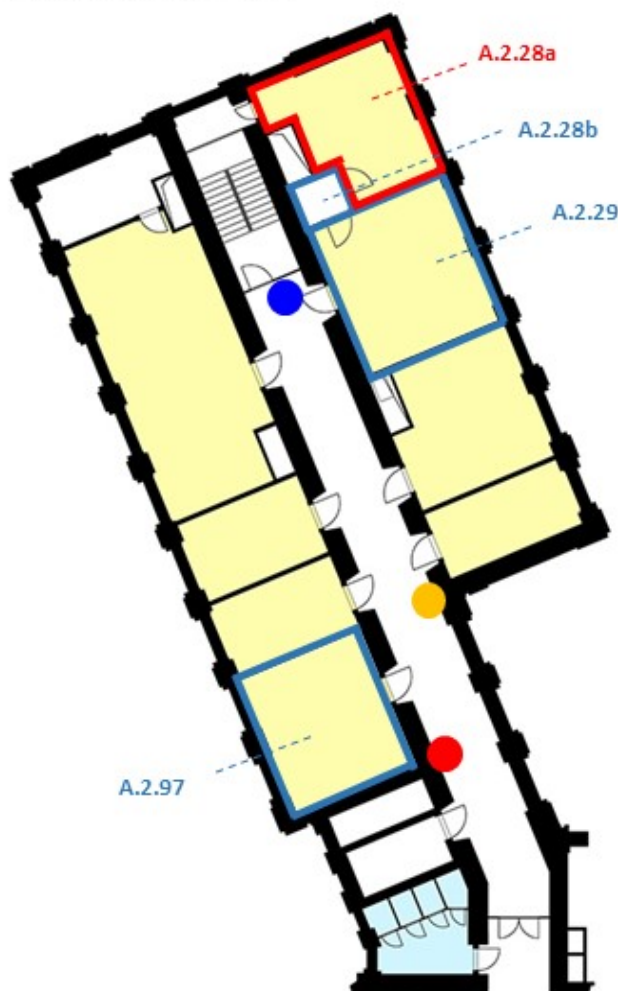


Detail půdorysů GMO laboratoří v budově A 2.NP

- středová část budovy A, 2.NP:



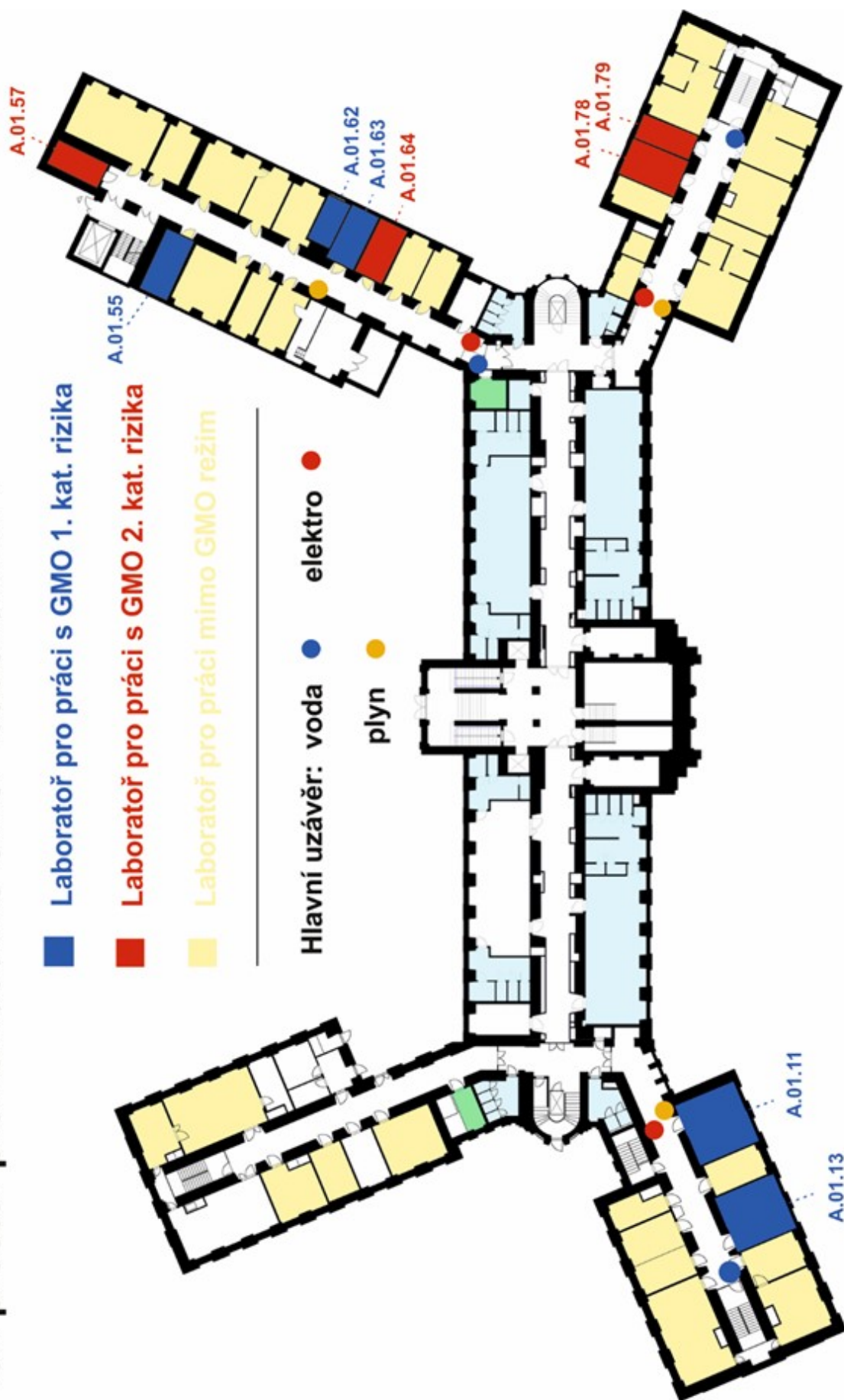
- severo-západní křídlo budovy A, 2.NP:



Hlavní uzávěř:

- vody ●
- plynu ●
- elektro ●

Plán prostor pro nakládání s GMO - budova A 1.PP



Detail půdorysů GMO laboratoří v budově A 1.PP

- severo-východní část budovy A, 1.PP:



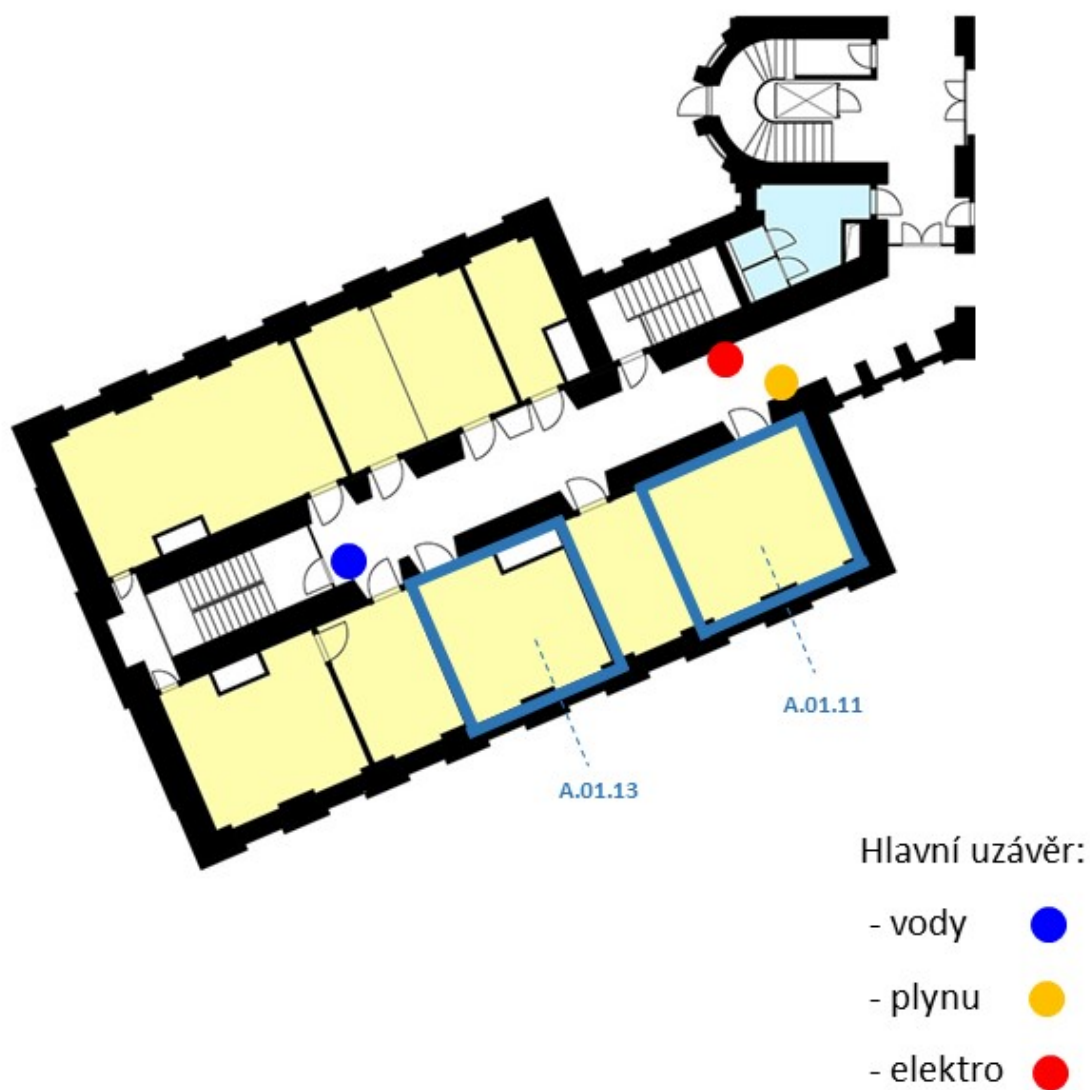
Hlavní uzávěr:

- vody ●
- plynu ●
- elektro ●

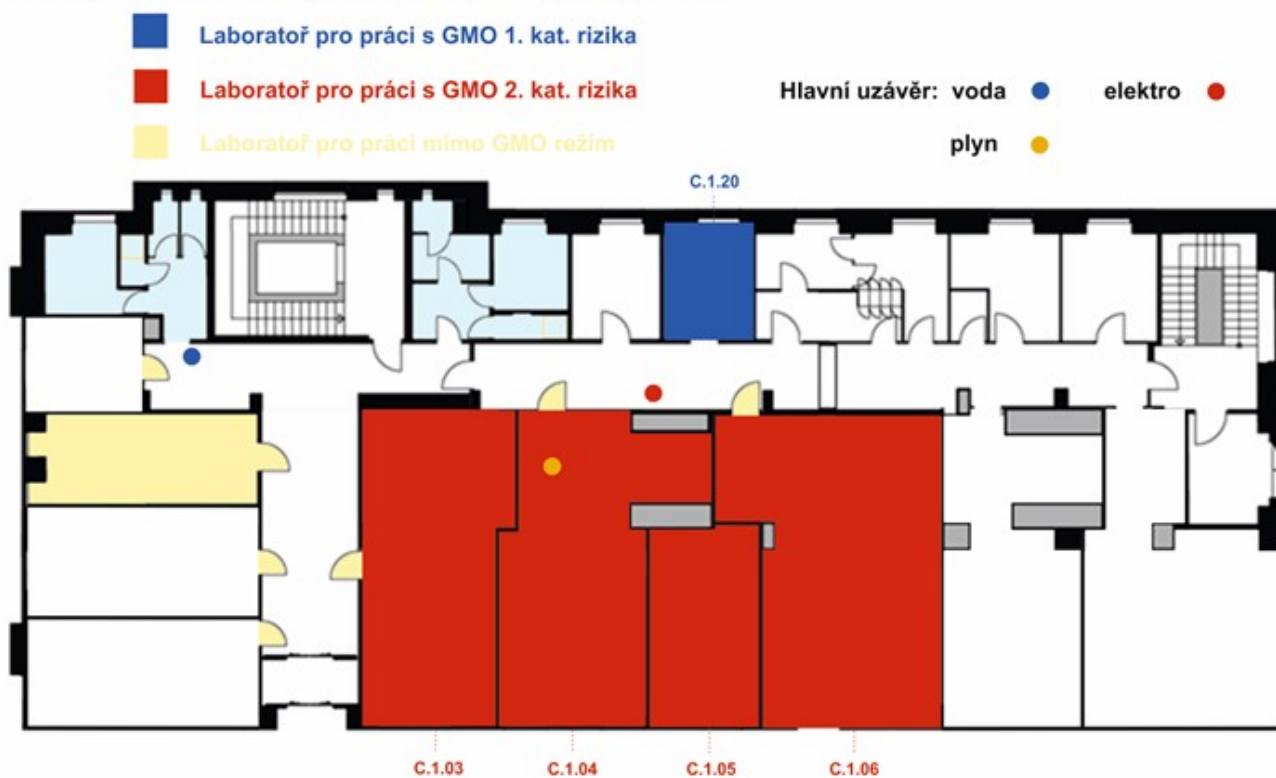
- jiho-východní část budovy A, 1.PP:



- jiho-západní křídlo budovy A, 1.PP:



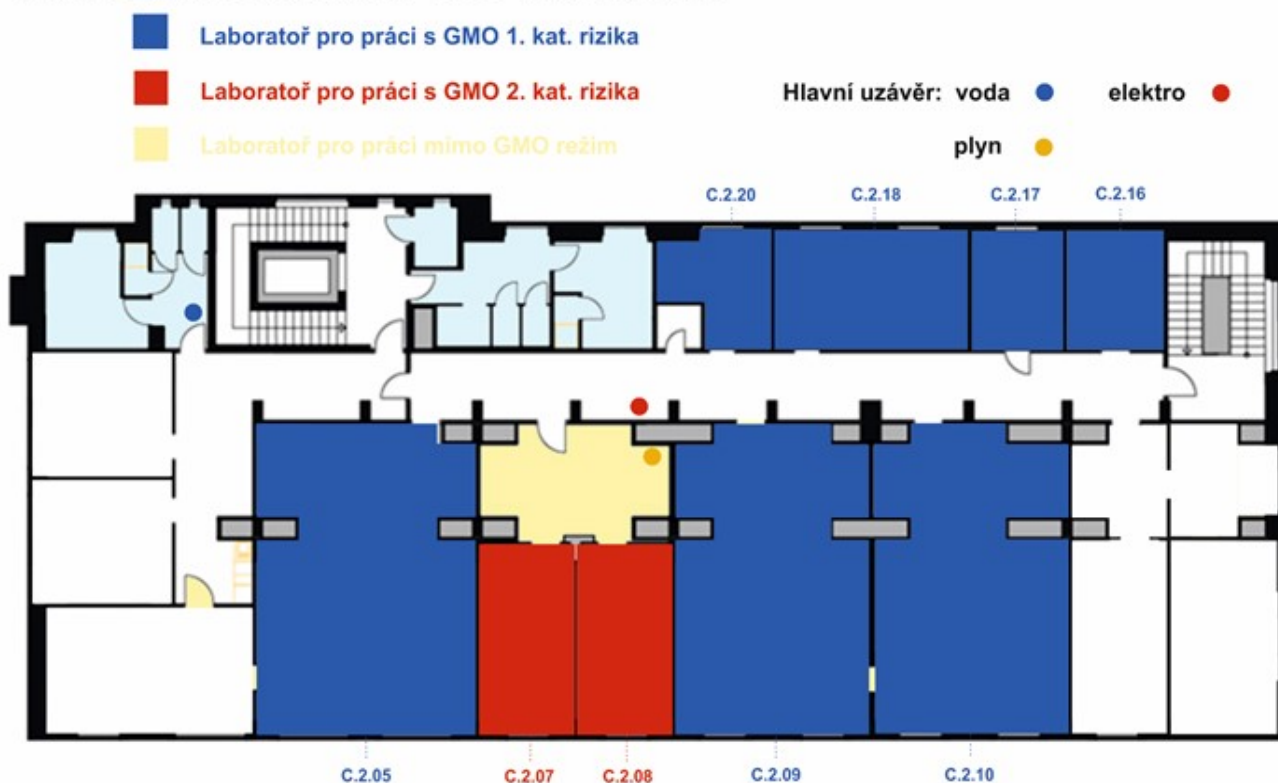
Plán prostor pro nakládání s GMO - budova C 1.NP



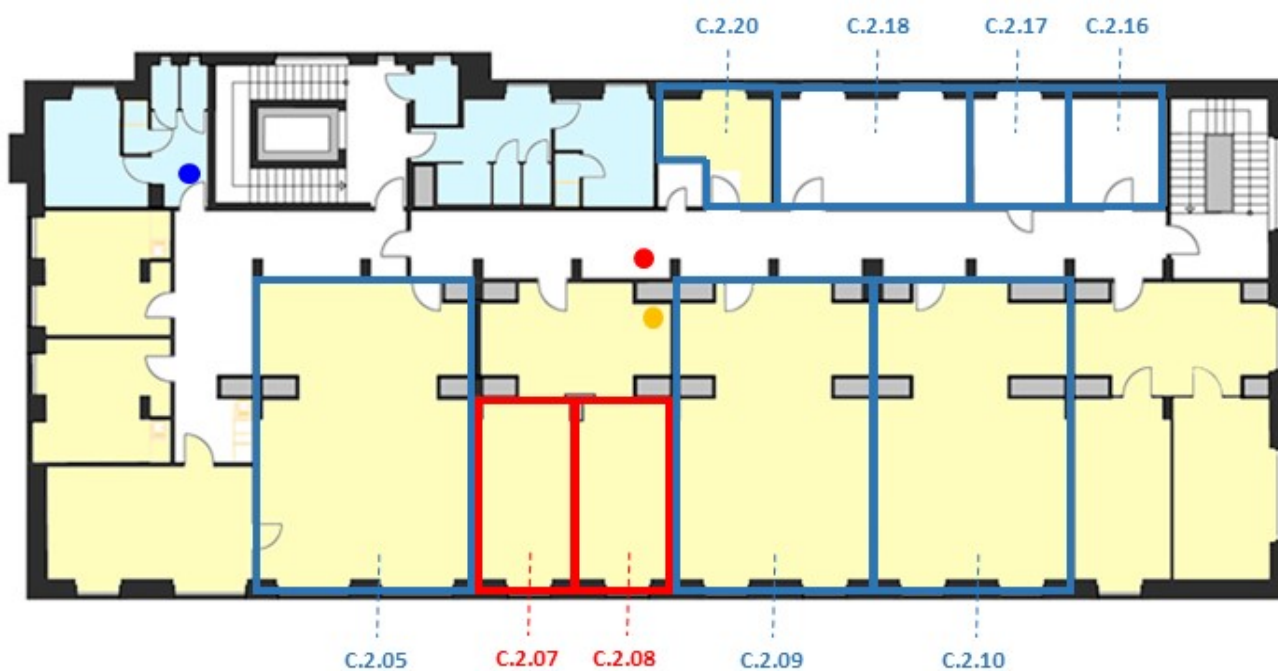
Detail půdorysů GMO laboratoří v budově C 1.NP



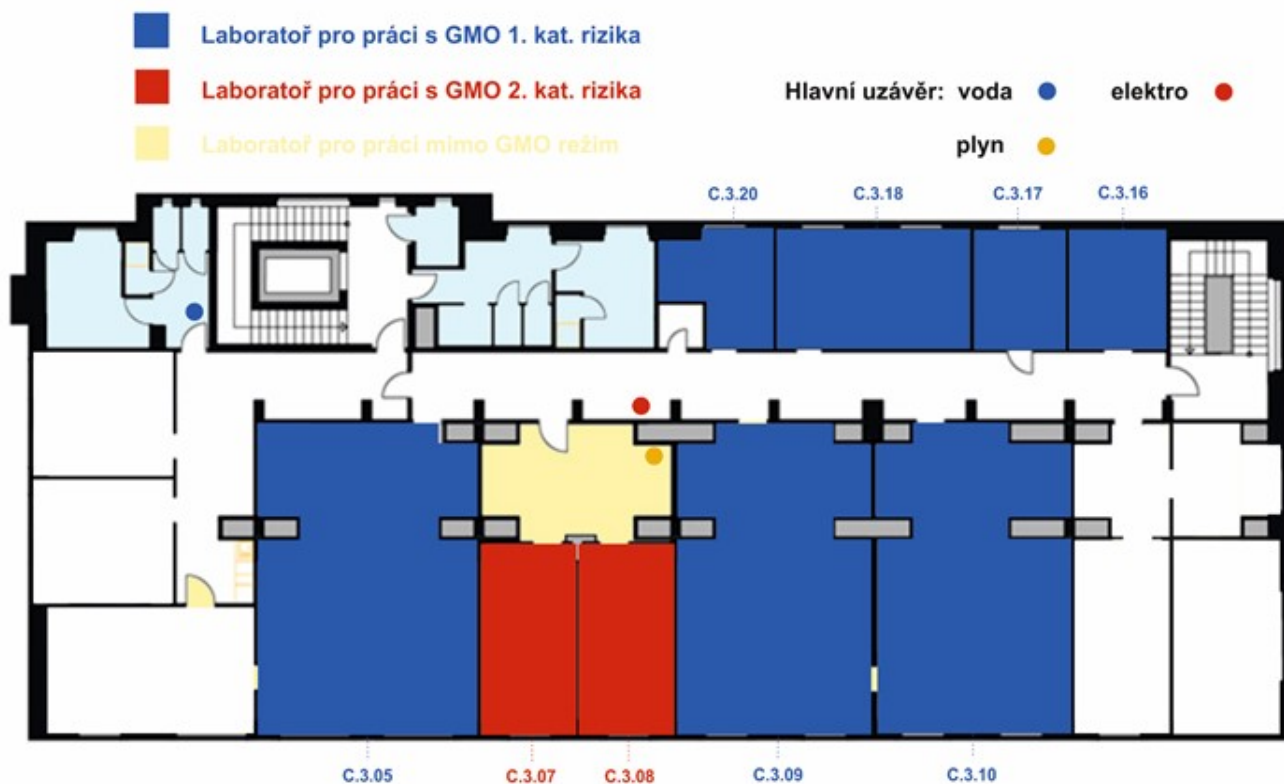
Plán prostor pro nakládání s GMO - budova C 2.NP



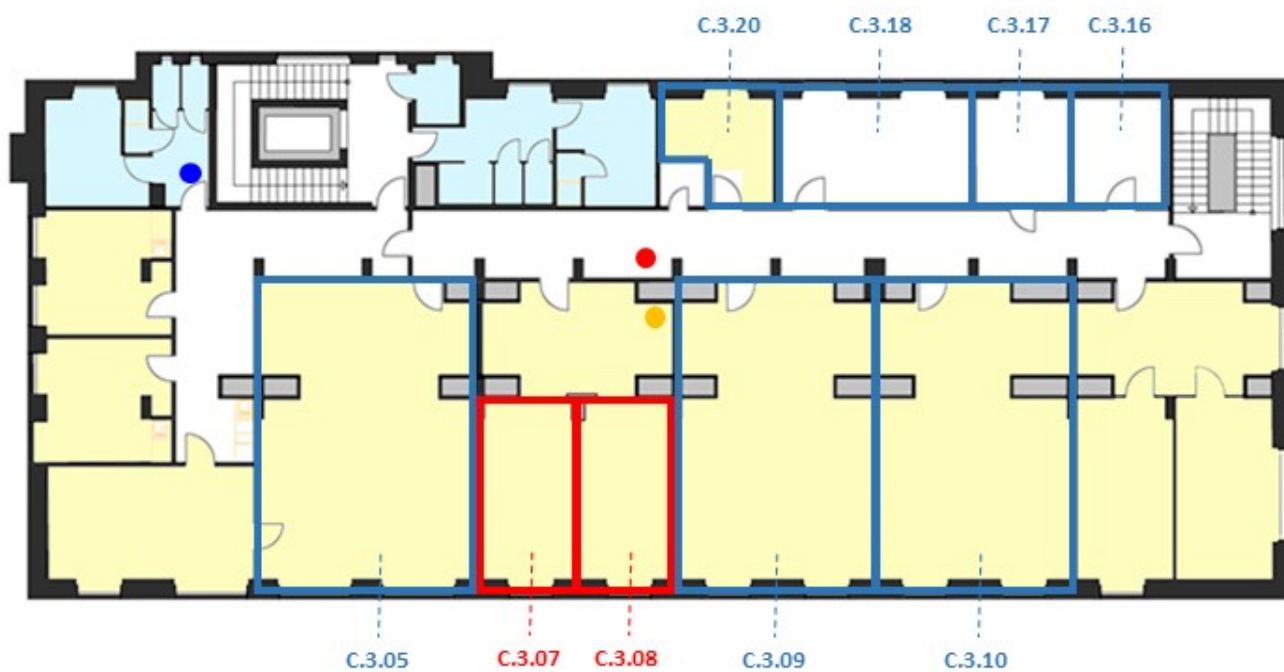
Detail půdorysů GMO laboratoří v budově C 2.NP



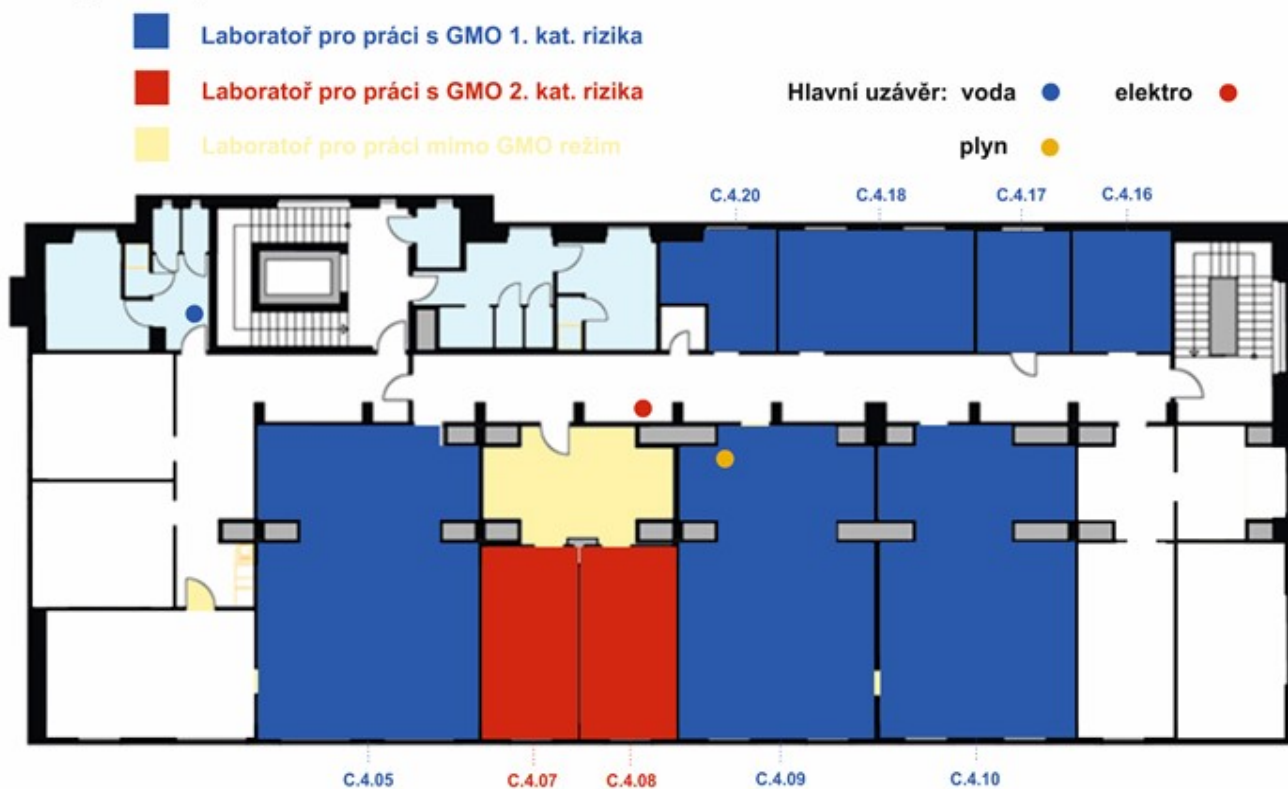
Plán prostor pro nakládání s GMO - budova C 3.NP



Detail půdorysů GMO laboratoří v budově C 3.NP



Plán prostor pro nakládání s GMO - budova C 4.NP



Detail půdorysů GMO laboratoří v budově C 4.NP

