



Ministerstvo životného prostredia SR Námestie Ľudovíta Štúra 1, 812 35 Bratislava Podateľňa I	
15. 02. 2024	
Evidenčné číslo:	Číslo spisu:
Prílohy/listy:	Vybavuje:

Ministerstvo životného prostredia SR
Sekcia obehového hospodárstva
Odbor environmentálnych rizík a
biologickej bezpečnosti
Nám. Ľ. Štúra
812 35 Bratislava

Váš list číslo/zo dňa

Naše číslo:
30/sekrdek/2024

Vybavuje/linka
doc. RNDr. Jana Korduláková,
02/9014 9547

Bratislava
15. 02. 2024

Vec: Žiadosť o vydanie súhlasu na činnosti zatriedené do RT3 v GMO zariadení PriF UK v Bratislave

Používateľ:

Univerzita Komenského v Bratislave
Šafárikovo nám. 6
P.O.BOX 440
814 99 Bratislava 1

IČO: 00397865

Štatutárny zástupca: prof. JUDr. Marek Števček, DrSc., rektor univerzity

Zariadenie:

Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta
Mlynská dolina, Ilkovičova 6
842 15 Bratislava

prof. RNDr. Peter Fedor, DrSc.
(dekan Prírodovedeckej fakulty - poverený štatutárny zástupca)

doc. RNDr. Vladimíra Džugasová, PhD.
(vedúca GMO projektov na PriF UK v Bratislave)

vybavuje: doc. RNDr. Jana Korduláková, PhD.
(Katedra biochémie PriF UK, tel. 02-9014 9547, e-mail: jana.kordulakova@uniba.sk)

Dátum podania žiadosti na prvé použitie zariadenia a dátum rozhodnutia

Podanie: 26.7.2017

Rozhodnutie: 20.10.2017





Evidenčné číslo uzavretého priestoru s úrovňou ochrany 3

589 0917 - Laboratórium č. 104 (Laboratórium je umiestnené v pavilóne CH1, na 2. podlaží, na Katedre biochémie, v rámci miestnosti CH1-311. Vstup do laboratória je cez personálnu priepusť (101) a tlakovú komoru-vstup (102). Výstup je cez tlakovú komoru-výstup (103) a personálnu priepusť (101).

Evidenčné číslo vedúcej projektu

Evidenčné číslo: 75/04/19

Meno a priezvisko: doc. RNDr. Vladimíra Džugasová, PhD.

Telefón: 02-9014 9302

e-mail: vladimira.dzugasova@uniba.sk

Celková doba trvania činnosti a dátum jej predpokladaného začatia

Predpokladané začatie: 1.4.2024

Doba trvania: doba neurčitá

Označenie príjemcu a parentálneho organizmu, ktorí sa majú použiť

Príjemcom geneticky modifikovaného materiálu sú kmene ľudského patogéna *Mycobacterium tuberculosis*, konkrétne *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* CDC1551, *M. tuberculosis* Erdman, a *M. tuberculosis* 18b.

Parentálnymi mikroorganizmami sú okrem uvedených kmeňov aj nepatogénne kmene *Mycobacterium smegmatis* a *Mycobacterium thermoresistibile*. Ďalšími darcami génov sú medúza *Aequorea Victoria*, *Streptococcus thermophilus*, Tn903 a R100.1 plazmid *E. coli*, *Streptomyces hygrosopicus*. Opis a charakteristika každého z týchto kmeňov je súčasťou priložených posudkov z posudzovania rizika.

Označenie použitého systému hostiteľ – vektor

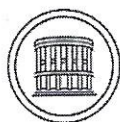
V projekte budú využívané vektory radov pVV, pMV, pND, pCG, pHAM, pJAM, pST, pGA, pJQ200, pPR27, pSE, pLJR a ich deriváty. Všetky uvedené vektory sú štandardne využívané, pričom prevažná časť z nich je dostupná komerčne (zbierka Addgene). Ich opis a charakteristika je súčasťou priložených posudkov z posudzovania rizika.

Údaj o zdroji a zamýšľanej funkcii genetického materiálu zahrnutého do genetickej zmeny

Zdrojom genetického materiálu sú kompletné genómy parentálnych kmeňov *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* CDC1551, *M. tuberculosis* Erdman, *M. tuberculosis* 18b, *M. smegmatis* a *M. thermoresistibile* a vybrané gény *Aequorea Victoria*, Tn903 a R100.1 plazmidu *E. coli*, *Streptomyces hygrosopicus* a *Streptococcus thermophilus*. Kompletný zoznam génov kódovaných príslušnými genómami, ako aj predpokladaná alebo charakterizovaná funkcia týchto génov, sú uvedené v prílohe, ktorá je súčasťou tejto žiadosti.

Projekty prof. Kataríny Mikušovej, DrSc. a doc. Jany Kordulákovej, PhD., v ktorých budú využívané výsledné GMM, sú zamerané na štúdium funkcie génov zúčastňujúcich sa rôznych aspektov metabolizmu mykobaktérií a na investigáciu mechanizmov pôsobenia účinných antimykobakteriálnych inhibítorov. V ich laboratóriu je testované široké spektrum látok s rôznymi

2





štruktúrami, a preto nie je možné predpovedať, ktoré metabolické dráhy sú ciele študovanými inhibítormi, a teda nie je možné z genómov používaných modelových mikroorganizmov vyčleniť konkrétne gény a žiadať o ich schválenie. Definitívny dôkaz o mechanizme pôsobenia študovaného inhibítora v bunkách prinesie až práca s rekombinantným cieľovým proteínom, a preto je potrebné mať vopred schválené všetky gény kódujúce potenciálne cieľové proteíny. Akýkoľvek iný model práce vzhľadom na pomalú generačnú dobu modelových mykobakteriálnych kmeňov (narastenie kolónie na tuhom médiu trvá minimálne 1 mesiac) znemožní úspešné riešenie projektov súvisiacich s danou problematikou. Pre riešené projekty je rovnako nevyhnutná možnosť pracovať s viacerými ortológmi génov z rôznych parentálnych mykobakteriálnych kmeňov, nakoľko tieto sa môžu líšiť napr. na úrovni stability produkcie príslušných proteínov, a teda v rôznych experimentoch je potrebné voliť rôzne kombinácie príjemcu a parentálneho mykobakteriálneho kmeňa.

Údaje o identite a charakteristikách geneticky modifikovaného organizmu

Výsledné GMM sú zaradené do rovnakej rizikovej triedy (RT₃) ako hostiteľské mikroorganizmy *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* CDC1551, *M. tuberculosis* Erdman a *M. tuberculosis* 18b. Práca s nimi bude uskutočnená v uzavretom priestore s treťou úrovňou ochrany (ev. č. 589 0917), ktorý spĺňa všetky požiadavky pre špecifiká tejto práce.

Údaj o plánovaných objemoch kultúr organizmov, ktoré sa majú použiť

Objem jednotlivých kultúr počas experimentov nepresiahne rádovo desiatky mililitrov. Objem jednotlivých zásobných konzerv, ktoré sú uskladnené v -80°C mraziacom boxe, je štandardne maximálne dva mililitre.

Opis ochranných opatrení, ktoré sa majú použiť, vrátane údajov o odpadovom hospodárstve a o nakladaní s odpadmi

Plánovaná činnosť bude prebiehať výlučne v zariadení č. 589 0917. Do samotného laboratória č. 104 sa vstupuje cez štyri bariéry:

1. Zamknuté dvere do miestnosti Ch₁₋₃₁₁, v ktorej je laboratórium umiestnené a zároveň je tu situované aj technické zázemie tohto laboratória. Z neho sa vstupuje do personálnej priepusti č. 101.
2. Zamknuté dvere do personálnej priepusti č. 101, z ktorej sa vstupuje do tlakovej komory č. 102. (Tu sú umiestnené aj dvere, ktorými sa vystupuje cez komoru č. 103, ale aj tento set dverí je uzamknutý).
3. Zamknuté dvere do tlakovej komory č. 102, z ktorej sa vstupuje do priestorov laboratória č. 104.
4. Zamknuté dvere do priestorov laboratória č. 104.

Tento uzavretý priestor, ktorého schválenie pre používanie na prácu s GMO RT₃ nadobudlo platnosť 25.10.2017, umožňuje dodržiavať zásady správnej mikrobiologickej praxe a vykonávať ochranné opatrenia vyplývajúce zo zaradenia do rizikovej triedy 3. Tieto zahŕňajú: izoláciu samotného laboratória od okolitého prostredia, pričom miestnosť je hermeticky uzatvoriteľná na dezinfekciu plynom, ľahko umývateľné povrchy odolné vode, kyselinám, zásadám, rozpúšťadlám, dezinfekčným látkam a dekontaminačným činidlám, vchod do laboratória cez dekontaminačnú miestnosť, nižší tlak úmerný tlaku okolitého prostredia, HEPA filtrovaný vzduch odsávaný z laboratória, laminárny box, prekladový autokláv na inaktiváciu GM mikroorganizmov v kontaminovanom materiáli a odpade, umývadlo so zabudovaným autoklávom zabezpečujúcim inaktiváciu odpadu, zákaz vstupu nepovolaným osobám, označenie bionebezpečnosti na dverách, ochranný odev, rukavice, návleky,





rúšku, kontrolu vektorov (hlodavcov a hmyzu) a okná umožňujúce monitorovanie prítomných v laboratóriu. Vzorky budú centrifugované pomocou rotorov so špeciálnymi kyvetami s bezpečnostným vrchnákom, pričom kyvety budú po centrifugácii otvárané v laminárnom boxe.

Prenosu patogénov do vonkajšieho prostredia bráni jednak štruktúra vybudovaného laboratória, ako aj organizácia práce v ňom. Pracovníci budú pracovať v ochranných odevoch, ktoré pozostávajú z:

1. Dezinfikovateľnej obuvi určenej pre tieto priestory, na ktorú budú ešte používať jednorazové návleky, ktoré budú po ukončení práce odhodnené do uzatvárateľného sáčku, ktorý je umiestnený v koši vo výstupe z laboratória v tlakovej komore 103. Obuv bude po použití uložená v personálnej priepusti č. 101 a pravidelne dezinfikovaná.
2. Jednorazového pracovného pláštá, ktorý bude po použití odhodnený do odpadu rovnako ako v bode 1.
3. Rúšky na ústa, ktorá bude po použití odhodnená do odpadu rovnako ako v bode 1.
4. Pokrývky hlavy, ktorá bude po použití odhodnená do odpadu rovnako ako v bode 1.
5. Rukavíc, pričom pracovníci budú počas pohybu v laboratóriu č. 104 nosiť jeden pár rukavíc, na ktorý si počas práce so vzorkami navlečú druhý pár štandardných rukavíc, ako aj ochranné návleky na rukávy. Vrchné rukavice alebo rukávové návleky si po ukončení práce vyzlečú v aktívnom laminárnom boxe, pričom tento odpad bude inaktivovaný autoklávaním. Spodné rukavice si pracovníci vyzlečú po opustení laboratória a odhodia ich do uzatvárateľného sáčku v tlakovej komore 103.

Odpad v tlakovej komore 103 bude na mesačnej, resp. podľa potreby na týždňovej báze zneškodnený autoklávaním.

Všetci pracovníci sú o rizikách ich práce poučení a majú platné očkovanie proti tuberkulóze.

Prírodovedecká fakulta UK v Bratislave má na základe rozhodnutia č. OÚ-BA-OSZP3-2021/078741-002/CEM/IV zo dňa 11.5.2021 udelený súhlas na zhromažďovanie nebezpečných odpadov do doby prevzatia organizáciou oprávnenou nakladať s nimi (kópia rozhodnutia je prílohou tejto žiadosti).

Účel použitia genetických technológií vrátane očakávaných výsledkov

Ide o základný vedecký výskum, ktorého výsledky nemožno vopred vymenovať, ale nie je vylúčené, že v budúcnosti môžu nájsť uplatnenie v medicínskej alebo biotechnologickej praxi. Pri práci sú štandardne využívané klonovanie a funkčná analýza génov. Výsledné GMM budú uskladnené v mraziacom boxe lokalizovanom v uzavretom priestore 589 0917 alebo po inaktivácii (chemicky alebo tepelne pomocou publikovaných a validovaných protokolov) analyzované štandardnými technikami.

Údaje o prevencii havárie a o havarijnom pláne vrátane údajov o nebezpečenstvách vyplývajúcich z umiestnenia zariadenia

Pracovníci sú povinní dodržiavať ochranné opatrenia a základy správnej mikrobiologickej praxe vyplývajúce z platnej legislatívy na úseku GMO, prevádzkový poriadok zariadenia, zásady bezpečnosti práce a protipožiarnej ochrany v infekčnom prostredí a pravidelne sa zúčastňujú príslušných školení. Havarijný plán vypracovaný pre uvedený uzavretý priestor zatriedený do RT₃ je uvedený v prílohe, ktorá je súčasťou tejto žiadosti.





Opis preventívnych opatrení, najmä bezpečnostného vybavenia zariadenia, poplachového systému a metód kontroly

Práca s GMM sa bude vykonávať v uzavretom priestore, ktorý je montovanými panelmi izolovaný od ostatných priestorov, pričom spoje sú utesnené silikónovým tmelom. V jednotlivých vstupných a výstupných priestoroch, ako aj v samotnom laboratóriu je udržiavaný minimálny podtlak 10 – 15 Pa, tlakový spád v laboratóriu je kontrolovaný „pretlakomermi“ umiestnenými v paneloch na hraniciach zón. Tlaková komora vo výstupe z laboratória je vybavená umývadlom a zariadením na dezinfekciu rúk, toto umývadlo má v odtoku zabudovaný autokláv na sterilizáciu odpadu. Vstup a výstup z priestoru sú zabezpečené cez „signalizáciu súčasne otvorených dverí“, ktorá je snímaná optickým snímačom umiestneným v zárubniach dverí. V prípade súčasného otvorenia viacerých dverí jednej, alebo oboch personálnych priepustí sa zapne akustická a vizuálna signalizácia. Prívod vzduchu do jednotlivých miestností je cez čisté nástavce bez filtračných vložiek. Odvod vzduchu z laboratória je riešený cez čisté nástavce, v ktorých sú umiestnené HEPA filtre triedy H14, vrátane predfiltrov, ktoré sú umiestnené pri podlahe.

V prípade výpadku elektriny laboratórium disponuje záložným zdrojom, ktorý umožňuje prácu v laminárnom boxe nasledujúcich minimálne 15 minút po výpadku, čo je dostatočne dlhý čas na ukončenie práce a vyčistenie pracovného priestoru v boxe.

V prípade možnej kontaminácie bude odobratá vzorka kontaminovaného materiálu, izolovaná DNA a príslušné sekvencie budú detegované pomocou PCR použitím špecifických primerov.

Opis postupov a plánov overovania stálej činnosti ochranných opatrení

Uzavretý priestor č. 589 0917 je konštantne riadený a monitorovaný mikroprocesorovým riadiacim systémom, ktorý hlási normálny, ako aj poruchový stav zariadenia (vizuálne svetelným hlásičom, ako aj definovaním charakteru poruchy) a sleduje a hlási prekročenie nastavených hodnôt tlakových strát filtrov klimajednotiek a referenčného HEPA filtra. Na základe tejto kontroly budú jednotlivé filtre menené podľa potreby.

Funkčnosť laminárneho boxu a prekladového autoklávu budú pravidelne kontrolované kvalifikovanými servisnými pracovníkmi.

Miesto uloženia dokumentácie

GMO dokumentácia je uložená u vedúcej projektov (B2-220) a na Katedre biochémie (CH1-214).

Prílohy žiadosti:

1. Posudky z posudzovania rizika činností súvisiacich s GMO RT₃, ktoré sa budú vykonávať v danom priestore. Hodnotenia génov. Zoznam ohlasovaných génov.
2. Stanovisko vedúcej projektu.
3. Havarijný plán.
4. Rozhodnutie o udelení súhlasu na zhromažďovanie nebezpečných odpadov.
5. Plnomocenstvo pre dekana PriF od rektora UK na jeho zastupovanie vo veciach zákona č. 151/2002 Z. z.

.....
prof. RNDr. Peter Fedor, DrSc.

dekan fakulty **UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE**

Prírodovedecká fakulta 5
Mlynská dolina, Ilkovičova 6
842 15 Bratislava - 1-

