



**NOTIFICACIÓN SOBRE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE  
ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE**

Nº de Registro:

Nº de Notificación:

**I. INFORMACIÓN GENERAL**

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)  
Dirección postal: Avda. Montañana, 930 C.P. 50059 Zaragoza

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Vicente Lacasa Azlor  
NIF: 17978650-X  
Cargo: Director Gerente  
Tel: 976 71 65 50  
Fax: 976 71 63 35  
Correo electrónico: direccion.cita@aragon.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Pilar M<sup>a</sup> Muñoz Álvaro  
NIF: 08917172-A  
Cargo: Doctora investigadora  
Tel: 976 71 37 99  
Correo electrónico: pmmunoz@cita-aragon.es

d) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad

Nombre y apellidos: José Vicente Lacasa Azlor  
NIF: 17978650-X  
Cargo: Director Gerente  
Tel: 976 71 65 50  
Fax: 976 71 63 35  
Correo electrónico: direccion.cita@aragon.es

e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto

Pilar M<sup>a</sup> Muñoz Álvaro



- 2) Debe señalarse si para la ejecución de esta actividad se recibe financiación del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación. Esta información es necesaria para determinar si la actividad se encuentra dentro del supuesto del artículo 3.2.b) de la Ley 9/2003 y, por lo tanto, la competencia recae en la Administración General del Estado.

SI    x                      NO   

- 3) Instalación donde se va a desarrollar la actividad de utilización confinada (cumplimente si previamente ha sido comunicada/autorizada para este tipo de actividades; en caso contrario, cumplimente el Formulario Parte B).

a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación:

b) Número de referencia del expediente:

## II. **DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:**

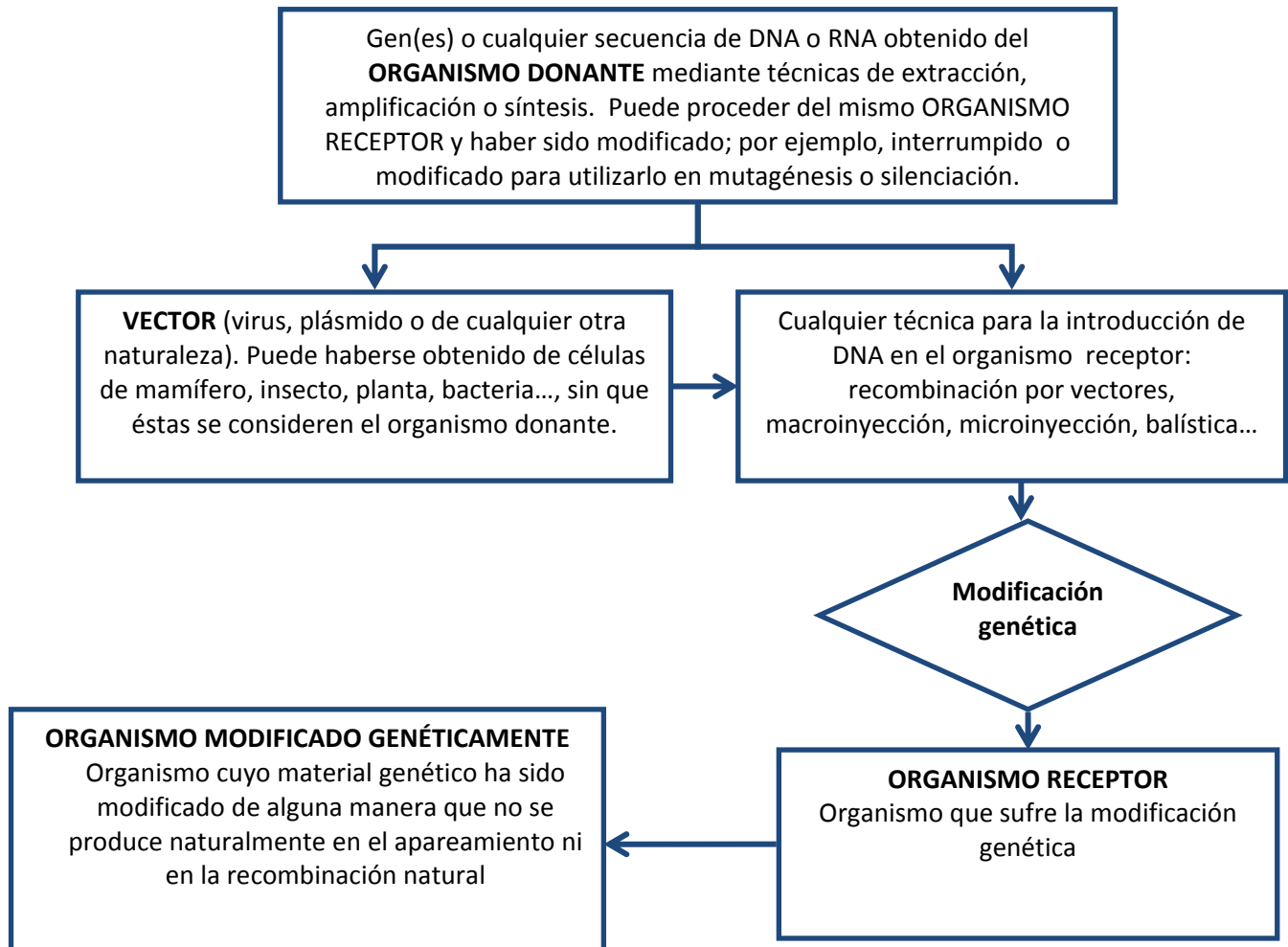
- 1) Finalidad de la actividad:

Obtención de vacunas atenuadas frente a la brucelosis animal

- 2) Clasificación de la actividad conforme al artículo 5 y Anexo III de la Directiva 98/81/CE y Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre:

Tipo 3

## PROCESO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE UN OMG A EFECTOS DE NOMENCLATURA:





### III. INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO RECEPTOR DEL CUAL SE DERIVA EL OMG

1) Nombre científico:

Bacteria: *Brucella suis* biovariedad 5

Taxonomía: Género *Brucella*; familia *Brucellaceae*;

Nombre común: B. suis

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento:

a) Técnicas de aislamiento:

El organismo receptor (*Brucella suis*) se conserva liofilizado en doble ampolla, bien a -80°C en crioviales con crioprotectores (glicerol, leche descremada o suero fetal-DMSO), en un congelador situado en una zona P3. Se aísla en placas de medio de cultivo rico (Blood Agar Base o trypticasa soja) que se incuban a 37°C durante 2-5 días. Esta cepa se encuentra en las instalaciones habilitadas de la Universidad de Navarra, que es donde tiene lugar la construcción del correspondiente OMG.

b) Técnicas de identificación:

Identificación convencional: Ureasa, oxidasa, aglutinación con acriflavina, tinción con cristal violeta-oxalato, aglutinación con sueros monoespecíficos anti-A y anti-M, sensibilidad a colorantes (tionina, fucsina y safranina), antibióticos (penicilina, estreptomycinina y polimixina B) y a los fagos Tb, Wb, Iz y R/C.

Identificación molecular: PCR específica

c) Marcadores genéticos:

Presencia de la secuencia IS711 o secuencias específicas de especie

d) Marcadores fenotípicos:

Agglutinación con antisueros específicos

e) Estabilidad genética:

Estables (ausencia de plásmidos u otros elementos genéticos intercambiables con otras bacterias, o entre las propias brucelas).

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Sin modificaciones genéticas previas.

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor o parental?

SI  NO



- 5) En caso afirmativo, especificar para qué clase de los organismos (seres humanos, animales, plantas) se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos extracelulares:

Los microorganismos vivos pueden ser patógenos para seres humanos y animales.

- 6) Si el organismo receptor o parental es patógeno para los seres humanos, especificar el grupo de riesgo asignado de acuerdo con la legislación comunitaria existente, (en particular la Directiva 2000/54/CE) o según otros sistemas de clasificación, nacionales o internacionales (OMS, NIH, etc.):

*Brucella suis*, (organismo receptor) está clasificada como patógeno tipo 3

- a) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

En humanos: los principales síntomas son fiebre, artromialgia y fibromialgia.

En animales (principalmente ganado porcino): aborto, lesiones testiculares e infertilidad.

- b) En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI  NO

Las construcciones por delección en genes, gran parte de cuyas secuencias han sido eliminadas, no pueden ser recuperadas de forma natural, ya que la bacteria no posee mecanismos de intercambio genético.

- 7) La cepa/línea celular receptora o parental: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

Sí.

- 8) Experiencia adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor:

Las personas que interviene en el proyecto (Dra. Pilar M. Muñoz, Dr. José M. Blasco y María Jesús de Miguel) llevan trabajando con distintas especies del género *Brucella* desde hace décadas y están familiarizadas con todos los aspectos relativos a la bioseguridad del patógeno.

- 9) Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:

- a) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?:

*Brucella suis* no se multiplica fuera de sus huéspedes o de las condiciones de cultivo. Sí es capaz de sobrevivir en el ambiente en determinadas condiciones, pero no de forma indefinida.



En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

- |       |                            |                          |
|-------|----------------------------|--------------------------|
| i)    | esporas                    | <input type="checkbox"/> |
| ii)   | endosporas                 | <input type="checkbox"/> |
| iii)  | quistes                    | <input type="checkbox"/> |
| iv)   | esclerocios                | <input type="checkbox"/> |
| v)    | esporas asexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |
| vi)   | esporas sexuales (hongos)  | <input type="checkbox"/> |
| vii)  | virus                      | <input type="checkbox"/> |
| viii) | otros, especifíquese       | <input type="checkbox"/> |

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

Son desfavorables el calor, la exposición a la luz o al sol y la sequedad.

d) Posibles nichos ecológicos:

Ninguno fuera de los huéspedes animales naturales.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

NO se multiplica en ambientes naturales (aparte de sus huéspedes).

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

a) Implicaciones en procesos ambientales (p.e. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo):

Ninguno.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Ninguno.

11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:

*Brucella suis* es una especie del género *Brucellae* de distribución mundial, dentro de la cual se distinguen distintas biovariedades. Las biovariedades 1, 2 y 3 afectan principalmente al ganado porcino, suidos silvestres (jabalí, cerdos salvajes etc..) y lépidos. La biovariedad 4 se ha descrito habitualmente en renos aunque también puede infectar alces, vacas y cánidos salvajes (zorro y lobo). Se sabe que estas biovariedades son potencialmente zoonóticas (con excepción de *B. suis* biovar 2, que es escasamente patógena para el hombre y solo se ha encontrado en pacientes inmunodeprimidos). El organismo receptor de este OMG es una cepa de *B. suis* biovariedad 5, la cual ha sido aislada exclusivamente en roedores salvajes y nunca, en humana.



12) Hábitat natural del organismo:

El interior de varios tipos de células (macrófagos, dendríticas, células epiteliales y otras) de sus huéspedes.

#### IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: *Escherichia coli*

Taxonomía: Familia: *Enterobacteriaceae* Género: *Escherichia*

Nombre común: *E. coli*

2) Tipo de material genético utilizado:

Plásmido derivado del vector pJQK (ver más adelante en la sección tipo de vector empleado en el proceso de modificación). Gene 1997 (202): 53-59. Estos habrán sido transferidos previamente de *E. coli* (organismo donante) a *Brucella suis* (organismo receptor). Este vector es suicida en *Brucella suis*. En él se clonará la ORF *wadC* deletada de los codones 16 a 308.

El organismo donante no se manipulará en las instalaciones del CITA, ya que los OGM son obtenidos en Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de Navarra (centro que ha sido autorizado previamente para trabajar con estos OGM).

3) Función prevista del material genético utilizado en la modificación genética:

Construcción de un mutante no polar de *Brucella* por delección en la ORF *wadC*. El mutante no lleva ningún marcador de resistencia adicional a antibióticos.

El vector pJQK y los plásmidos de él derivados son suicidas en *Brucella suis* (ver más adelante). Cuando se introducen en *Brucella suis* se produce una recombinación genética que lleva a la sustitución del gen salvaje, presente en el cromosoma, por el gen delecionado, presente en el plásmido.

La función prevista del material genético es la creación de un mutante no polar, mediante la sustitución del gen salvaje por el gen con una delección que no altere el marco de lectura.

El plásmido suicida, al no poder replicarse en *Brucella* se extingue.

4) ¿Es patógeno o nocivo de cualquier otra forma (incluidos sus productos extracelulares) el organismo donante, vivo o muerto?

SI  NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

- |      |               |                          |
|------|---------------|--------------------------|
| i)   | seres humanos | <input type="checkbox"/> |
| ii)  | animales      | <input type="checkbox"/> |
| iii) | plantas       | <input type="checkbox"/> |



b) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

No procede (el organismo no es patógeno).

c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?

No procede

5) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

No.

## V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

- |                                   |                          |
|-----------------------------------|--------------------------|
| a) Inserción de material genético | <input type="checkbox"/> |
| b) Deleción de material genético  | x                        |
| c) Sustitución de bases           | <input type="checkbox"/> |
| d) Fusión celular                 | <input type="checkbox"/> |
| e) Otros, especifíquese           |                          |

2) Finalidad de la modificación genética:

Generar atenuación o avirulencia

3) Método utilizado para llevar a cabo la modificación genética:

El plásmido derivado de pJQK en el que se ha clonado la ORF wadC delecionada se introducirá en *Brucella suis* por conjugación. El plásmido es suicida y no puede replicarse en *Brucella suis*. Se producirá la recombinación homóloga entre el gen salvaje presente en el cromosoma y el gen delecionado presente en el plásmido.

El resultado final de este proceso es la sustitución en el cromosoma de *Brucella suis* del gen salvaje por el gen delecionado. El mutante obtenido es no polar y no lleva ningún marcador de resistencia a antibiótico adicional. El plásmido suicida, al no poder replicarse en *Brucella suis*, se extingue. Para más información ver la referencia:

Conde-Alvarez, R., Grilló, M.J., Salcedo, S.P., de Miguel, M.J., Fugier, E., Gorvel, J.P., Moriyón, I. and M. Iriarte. 2006. Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella abortus*. Cell. Microbiol. 8 : 1322-1335

4) ¿Se ha utilizado un vector en el proceso de modificación?

SÍ  NO



En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

Plásmido derivado del vector pJQK (también llamado pJQKm) (Scupham and Triplett, 1997)

El vector pJQK y sus derivados son suicidas (es decir no pueden replicarse) en *Brucella suis*, y ello lleva a la extinción del plásmido. En este vector se clonará la ORF delecionada. El plásmido derivado de pJQK que contiene la ORF wadC delecionada se denomina pRCI-26

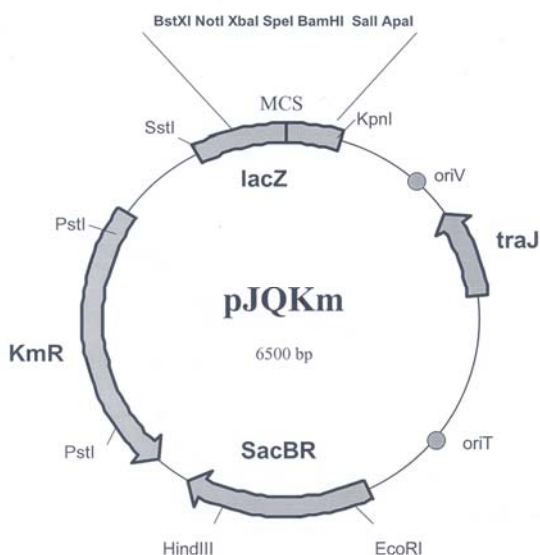
Referencia donde se describe el vector pJQK: Gene 1997 (202): 53-59

b) Dimensiones del vector (pares de bases):

El vector origina pJQK tiene 6,5 kb y el inserto 935 pares de bases

c) Aportar mapa de restricción del vector (funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes en el vector):

Se muestra la carta del vector pJQK (pJQKm) con los genes y sitios de restricción más significativos. En el polisitio de clonage (MCS) se clonará la ORF wadC delecionada





### Características más importantes del vector pJQKm y sus derivados

**Km<sup>R</sup>**: Gen que confiere resistencia a Kanamicina.

**sacBR**: Gen que confiere la sensibilidad a la sacarosa

**oriV**: Origen de replicación (p15a ori de pACYC184). Funcional sólo en enterobacterias

**oriT**: Origen de transferencia RP4. Permite la movilización del plásmido en bacterias Gram negativas

**lacZα**: codifica el péptido alfa de la beta-galactosidasa. Permite la identificación de fragmentos clonados

**traJ**: codifica la proteína que se une a oriT y se requiere para la transferencia del plásmido durante el proceso de conjugación.

c) Gama de hospedadores del vector:  
Enterobacterias

d) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

El vector es únicamente movilizable entre una bacteria Gram negativa previamente tratada y un *E. coli* específico que contenga el plásmido, y únicamente en condiciones óptimas de incubación (37°C)

ii) Si el vector es un bacteriófago, un cósmido o un fásmid, ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?

No procede

iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?

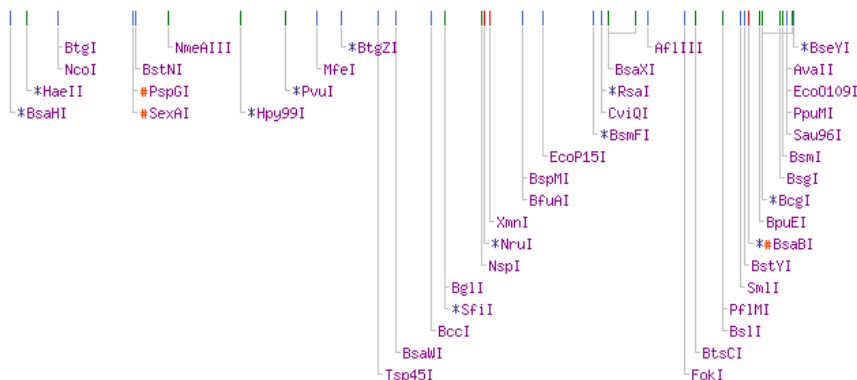
Si, pero únicamente en las condiciones de movilización descritas arriba

5) Información del inserto:

a) Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia:

Inserto de 935 pares de bases. Mapa de restricción derivado de introducir la secuencia en

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>



Secuencia:



```
ctggcgtcagcaatcagagcgcctcggatcattgaggcaatcgccgaagcgcgcgcc
catgggatctgtcggaaaacgccgaatatcacgccccaaggaagcccagagcctcaat
gaagggcgcacgaattggaagacctggtgacgcgcgaggtgatcgtgttcc
aagttgacgggacagagatcaaattcgggtgcgaccgttacgatgatcgaagacacc
gaagaagaaaaatctaccagatcgtcggcgatcaggaagccgatgtgaaggaaggccgt
atttcgatttctcctccgatcgcgcgccttatcggcaagggcgaaggcgacacaatt
gaggtcaacgcaccggcggtcgcgttcctacgaaatcatcgcttgaaattcgtctga
tttccgtagctttatcaggccaagttccggttcgggaagttgaggtcgttgcacacgcc
atcgaaccttatctggccgatccggccatgacaaaacgctgcggcgaaaatgctctggcg
catgttcggaagcctttccgctccaaaaggaagcggctgctatcagcagcgtttatgag
caggttttcgaggaagataatccgggtcagaggatcatcaacggttcgtccttgacggg
acgaatggtgagggctgtcgtaccgaatccacggttgagcggcggtcagttcctcgtat
cacgaaagtctggaacgtgttgagatcgcgcgcaacgcaatggagcaggaagtcggattc
acccgaaatcatccatcgcggcgaacgagcggccattgctggtctttcggcgaaagc
cttgagatccgcacgcctgacggtgcagcccaaccgagcagaatgccacaaggtcctg
cccagcgtattgccgttgagaatcgcacgatagccg
```

b) Origen y función específica de cada parte del inserto

El inserto contiene la ORF wadC deletada desde el codon 16 al 308, flanqueada por 424 pares de bases por delante del codon de iniciación ("start") y 316 pares de bases por detrás del codon de parada ("stop")

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

El plásmido derivado de pJQK donde se ha clonado el gen wadC deletado se introdujo por transformación en la cepa de *E.coli* S17  $\lambda$ -pyr (Nal<sup>r</sup>) y se transfirió a *B. suis* (Nal<sup>r</sup>, Km<sup>r</sup>) por conjugación. El plásmido derivado de pJQK no puede replicarse en *Brucella* y, por lo tanto, el gen mutado presente en este plásmido se recombinará con la región correspondiente del cromosoma de *Brucella suis* donde se encuentra el gen salvaje. Los exconjugantes donde se produjo la primera recombinación y, por lo tanto, la integración de todo el plásmido suicida en el cromosoma, se seleccionaron sobre placas de TSA con nalidixico y kanamicina mantenidas a 37°C.

Para favorecer la segunda recombinación, las bacterias se crecieron a 37 °C, en medio líquido con agitación, en presencia de nalidixico, pero sin kanamicina. Aquellas en las que se produjo la doble recombinación, se seleccionaron en TSA con nalidixico y sacarosa al 5% y se comprobó que se habían vuelto sensibles a la kanamicina. Para diferenciar los clones en los que la segunda recombinación había dado lugar a la recuperación del gen salvaje, de aquellos en los que se había producido la sustitución del gen salvaje por el gen mutado, se realizó una PCR con cebadores que flanquean la ORF. En el primer caso (recuperación del gen salvaje) el tamaño esperado del fragmento será mayor que en el segundo (obtención del mutante).

d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:

ORF wadC deletada

e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:

No se dispone de información



f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí

g) ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese.

No

h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.

No.

## **VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE**

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?

No

En caso afirmativo:

i) Número de copias  
No procede.

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?  
No procede.

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?

No procede.

En caso afirmativo:

i) número de copias:

ii) localización cromosómica:

iii) secuencias laterales:

iv) ¿La inserción inactiva la expresión de otros genes?:

c) Si se trata de un virus:

- i) Es defectivo
- ii) Es potencialmente inducible



d) Análisis moleculares realizados relativos a la expresión del producto deseado (PCR, Northern, secuenciación, otros):

- i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)
- ii) Transcripcionales (síntesis de niveles de mRNA)
- iii) Traduccionales (síntesis de niveles de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto.

No procede

2) Características genéticas y fenotípicas modificadas del organismo receptor o parental como resultado de la manipulación genética:

a) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese:

No

b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción?

No

En caso afirmativo, especifíquese:

c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:

No.

d) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese:

No

e) Marcadores específicos del OMG:

El OMG no posee ningún marcador específico que lo diferencia de la cepa original

3) Estabilidad genética del OMG (Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones)

El OMG es estable indefinidamente.

4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos:

No existe.

5) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar.

El OMG está atenuado en animales de laboratorio



6) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.

El OMG se puede diferenciar de la cepa parental mediante una reacción de PCR empleando dos oligonucleótidos que hibriden uno con la región situada antes del codon de iniciación de la ORF y otro con la región situada inmediatamente después del codon "stop" de la ORF. El tamaño del fragmento PCR obtenido será mayor en el caso de la cepa parental que en el caso del OMG

b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente.

El OMG no va a ser liberado al medio ambiente.

**VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES**

1) Naturaleza de las operaciones:

- a) Enseñanza
- b) Investigación x
- c) Desarrollo

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

- a) Volumen máximo en el caso de microorganismos: 15ml ( $10^9$  ufc/ml)
- b) Número de plantas:
- c) Número de animales:

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada

(Debe concretarse lo más posible la duración de la actividad (por ejemplo, teniendo en consideración la duración de la financiación de los proyectos a los que están asociados las actividades con los OMG).

3 años (2015-2018)

4) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados:

Desarrollo de una vacuna eficaz contra la infección por *Brucella suis*. Se realizará la tipificación fenotípica del OMG para detectar posibles diferencias frente a la cepa parental. A continuación se realizarán ensayos de virulencia y protección en modelo murino (con ratonas BalbC). En estos ensayos esperamos demostrar la atenuación de la virulencia del OMG respecto a la cepa parental y su eficacia como vacuna frente la infección experimental por *B. suis* en el modelo ratón.



- 5) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa (señalar nombre y ubicación), y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG:

Este OMG es obtenido en el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) por investigadores de la Universidad de Navarra. Dicho centro está registrado conforme a la normativa vigente y ha sido autorizado para trabajar con este OMG.

- 6) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo en virtud de la legislación aplicable<sup>1</sup> (tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

El OMG se transportará por una empresa autorizada, siguiendo el protocolo específico para el transporte de sustancias biológicas clase B.

- 7) Descripción de los métodos de manejo de los OMG (incluyendo descripción de las fases de cultivo y concentración máxima de OMG en el cultivo):

Los subcultivos del OMG se realizarán mediante repicado y extensión con asa de siembra en 2 ó 3 placas de Petri con medio sólido (BAB) e incubación en estufa (37°C) durante 24-48h. Las suspensiones bacterianas para la preparación de inóculos vacunales tendrán un volumen total máximo de 15 mL ( $10^5$  UFC/mL), repartidos en tubos de 5mL cada uno.

La vacunación de los ratones de experimentación se realizará por vía subcutánea con inóculos de 0.1mL ( $10^5$  UFC).

- 8) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse:

Tanto los subcultivos como los inóculos del OMG se realizarán en el interior de cabinas de seguridad biológica BIO-II-A (Telstar) situadas dentro del **Laboratorio de Microbiología** con nivel de contención 3 del Edificio I+D del CITA (se adjunta el Parte B correspondiente). Este laboratorio tiene acceso restringido (mediante carteles indicativos), se encuentra en depresión respecto a las zonas contiguas y dispone de filtros HEPA absolutos para filtrar el aire que sale al exterior. La manipulación del OMG será siempre realizada por personal especializado y entrenado para el trabajo con este tipo de microorganismos, provisto de los EPI adecuados (guantes de nitrilo, bata, gorro y calzas desechables).

Los experimentos con ratones se realizarán en el **Animalario registrado (ES502970012005)** del CITA (se adjunta el Parte B correspondiente). Los animales inoculados con el OMG se

---

<sup>1</sup> Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- Reglamento (CE) N° 1946/2003, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente. El formulario necesario para acompañar a los OMG en el transporte, puede encontrarse en el siguiente enlace: (<http://www.biodiv.org/biosafety/cop-mop/result.aspx?id=8288&lg=1> )
- Normativa nacional e internacional (OACI/IATA, OMI/MDG, TPF/RID y TPD/ADR) para el transporte de mercancías peligrosas y, en particular, de sustancias infecciosas y muestras para diagnóstico.



ubicarán en jaulas cerradas (con comederos y bebederos) en una sala a la que se accede a través de un pasillo con tres puertas consecutivas. Tanto los inóculos bacterianos como los animales se manipularán en el interior de una cabina de seguridad biológica IBL-55 (Indelab). La sala donde se alojarán los animales infectados está dotada de un sistema de eliminación de aire con control microbiológico mediante filtros HEPA del 99,9%.

Los residuos biológicos serán inactivados mediante autoclavado o baño con propanol y serán introducidos en cubos de cierre hermético, junto con el material fungible y los cadáveres de los ratones, para su retirada y eliminación por parte de la empresa gestora de residuos autorizada. Las aguas procedentes de los laboratorios serán tratadas antes de su vertido final al colector general. El animalario dispone de un depósito aislado anexo para la recogida y tratamiento de las aguas.

El personal que realizará las actividades ha recibido formación específica para trabajar con estos microorganismos y animales y dispone de los EPI adecuados (batas, gorros, calzas, guantes, mascarillas y gafas de protección) para desarrollar sus tareas sin riesgo

#### **VIII.- INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN**

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

No procede

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

- El **Laboratorio de Microbiología P3** se mantiene a temperatura 22- 26 °C, controlada por un sistema automático de climatización que es revisado diariamente por el personal de mantenimiento.

- **El Animalario registrado (ES502970012005)** mantiene las condiciones ambientales controladas según legislación de protección de animales de experimentación (Tª: 20-24 °C, Humedad relativa: 40-70%)

3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista:

La manipulación de este OMG tendrá lugar en el Laboratorio de Microbiología y en el animalario registrado (ES502970012005) del CITA, con nivel de contención P3 (se adjuntan los Partes B correspondientes)

Ver planos adjuntos:

**Plano 1.** Plano de localización de las instalaciones dentro Del Campus Del CITA

**Plano 2.** Plano de instalaciones P3 (Esclusas / vestuario / Laboratorio de microbiología / Laboratorio de limpieza y desinfección / animalarios).

**Plano 3.** Plano del Animalario registrado (ES502970012005).





## **IX. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA**

El acceso a las instalaciones se realiza mediante autorización expresa por parte de los responsables de la instalación.

El acceso al **Laboratorio de Microbiología P3** se realiza a través del paso por diferentes esclusas con caída secuencial de la presión de modo que el laboratorio queda en depresión respecto a las zonas contiguas. A lo largo de dichas esclusas los investigadores y técnicos se cambian de ropa, desprendiéndose de su indumentaria habitual y vistiéndose con batas, calzas, gorro y guantes desechables. De igual modo, a la salida de las instalaciones, el personal se deshace de la ropa de trabajo y se viste con su indumentaria habitual.

La manipulación de los agentes biológicos se realiza dentro de cabinas de seguridad biológica.

La instalación dispone de duchas, fuentes lavajojos de descontaminación y botiquín de primeros auxilios.

La desinfección del material biológico se realiza con propanol (líquidos) y/o autoclavado (líquidos y sólidos).

### 1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Existen protocolos para todos los procedimientos y manuales de bioseguridad.

### 2) Formación del personal adscrito:

Todo el personal ha recibido formación específica para el trabajo con patógenos de nivel 3 y está acreditado para el manejo de animales de experimentación (categorías A y B). Los investigadores responsables de la actividad (José M<sup>a</sup> Blasco, Pilar M<sup>a</sup> Muñoz y María Jesús de Miguel) tienen amplia experiencia en la realización de proyectos de investigación con patógenos tipo 3 (particularmente con *Brucella*) y OGM (como demuestra su curriculum) y están acreditados para el uso de animales de experimentación (categorías A, B y C).

### 3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Limpieza de las cabinas de seguridad biológica, tras su uso, con propanol (Propano AF -Esteer-Pharma-) seguida de irradiación con UV. Para superficies también se utiliza propanol. La salida de materiales y residuos se realiza a través de autoclave o SAS. Existe la posibilidad de descontaminación ambiental por nebulización con formol-amoniaco de las salas y equipos utilizados.

### 4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

El centro tiene asignado personal de mantenimiento adecuadamente formado para la vigilancia y control de las medidas de confinamiento y condiciones de climatización.

Se realizan revisiones anuales y cambios de filtros tanto del sistema de ventilación como de las cabinas de seguridad biológica.



La eficacia de los autoclaves se verifica mediante el uso en cada carga de indicadores físicos de esterilización (cinta térmica), y mensualmente, mediante indicadores biológicos.

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Inspecciones por la autoridad competente del Gobierno de Aragón.

**X.- GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS**

1) Encargado de la gestión de residuos:

gestión interna: Sí  NO

gestión por una empresa externa: Sí  NO

Si es el caso, nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:

SRCL Consenur

2) Inactivación de residuos: método, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados

Los residuos biológicos son inactivados con propanol o autoclavados e introducidos en cubos de cierre hermético, junto con el material fungible contaminado y los cadáveres de los ratones, para su gestión y eliminación a través de la empresa de gestión de residuos autorizada (los cubos son proporcionados por dicha empresa). El material punzante es introducido en cubos específicos gestionados por la misma empresa. **El laboratorio P3** dispone de sistema tratamiento de aguas antes del vertido final al colector general. **El animalario** dispone de un depósito aislado en el que se recogen las aguas para su posterior tratamiento.

**XI. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES (Cumplimentar para los tipos 2, 3 y 4)**

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

El accidente en este caso se podría producir por derrame o por rotura de tubos que contengan el microorganismo con improbable formación de aerosoles (ya que el volumen de solución bacteriana a manejar en cada actividad es bajo) o por pinchazos o cortes con material contaminado.

2) Equipamiento de seguridad (específiquese):

Acceso restringido al personal autorizado en todas las instalaciones mediante carteles indicativos y puertas de acceso bajo llave.

El personal dispone de los EPI adecuados y ropa de uso desechable (monos, batas, calzado, guantes, mascarillas y gafas de protección).

El **Laboratorio de Microbiología P3** dispone de cabinas de seguridad biológica (BIO-II A – Telstar-) y se encuentra en depresión respecto a las zonas contiguas; existe ventilación de



entrada y salida con filtros HEPA absolutos; se dispone de autoclaves y SAS. Hay ventana para la visualización del interior del laboratorio y teléfono conectado con el exterior.

**El animalario** también dispone de sistema de ventilación con filtro HEPA absolutos y autoclave *in situ*.

Se dispone de instalación contra incendios con un mantenimiento contratado, fuentes lavaojos, duchas de seguridad y botiquines de primeros auxilios.

Todo el material contaminado es inactivado mediante el uso de autoclaves o baños con propanol.

### 3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Todos los trabajadores han realizado el Curso de Prevención de Riesgos Biológicos que imparte el Servicio de Prevención de Riesgos Laborales de la Dirección General de Función Pública del Gobierno de Aragón y ha sido instruido por el responsable de bioseguridad sobre las medidas de emergencia a aplicar ante un accidente. Además, este personal ha recibido formación acreditada para el manejo de animales de experimentación animal (categorías A y B, como mínimo).

### 4) Planes de emergencia:

Ante accidentes derivados de la actividad se tomarán las siguientes medidas

a) Retirar del área al resto del personal e impedir el acceso al área.

b) Avisar (por orden y si es necesario al propio domicilio):

- al Responsable de Seguridad.
- a uno de los Doctores del Departamento.

c) Usar mono, calzas, gorro, guantes, gafas y mascarilla de filtro HEPA para las intervenciones.

d) En caso de rotura de tubos o viales (está previsto trabajar con menos de 15ml de suspensión bacteriana) o de placas con cultivo:

- Cubrir los derrames con exceso de producto desinfectante (propanol) y dejar actuar durante 30 minutos antes de limpiar con papel absorbente.
- Desechar los residuos en cubo con cierre hermético (proporcionado por la empresa autorizada para la gestión de residuos biológicos).
- Si se estima necesario (en función de volumen del residuo derramado), realizar una descontaminación ambiental de la sala por nebulización con formol-amoniaco durante 6h.

e) En el caso de accidente físico:

- Exposición ocular a aerosoles o salpicaduras:

Lavar al menos 15 minutos con agua.

Acudir al hospital para evaluación y tratamiento.



- Exposición a agujas o material punzante.

Lavar cuidadosamente la zona herida con agua corriente sin restregar

Dejar manar la sangre durante 2-3 minutos (inducir el sangrado)

Desinfectar la herida con povidona yodada (u otro desinfectante)

Cubrir la herida con un apósito impermeable

En caso de herida grave, acudir al hospital para evaluación y tratamiento.

Ante la sospecha de infección accidental en el laboratorio, se realizará un tratamiento profiláctico con doxiciclina a dosis normal durante 7 días. En caso de confirmarse la infección se tratará con estreptomicina (15 días) combinada con doxiciclina (45 días).



**EVALUACIÓN DE RIESGO DE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE  
ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
-----------------	---------------------

**Cumplimentar un formulario tipo C por cada actividad tipo 2, 3 o 4. En caso de actividades tipo 1, deben seguirse las instrucciones recogidas en el apartado III.1.a de la Guía para la remisión de solicitudes de registro de instalaciones.**

**I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD**

a) Entidad

Nombre: Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)  
Dirección postal: Avda. Montañana, 930 C.P. 50059 Zaragoza

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Vicente Lacasa Azlor  
NIF: 17978650-X  
Cargo: Director Gerente  
Tel: 976 71 65 50  
Fax: 976 71 63 35  
Correo electrónico: direccion.cita@aragon.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Pilar María Muñoz Álvaro  
NIF: 08917172A  
Cargo: Doctora Investigadora  
Tel: 976 71 3799  
Correo electrónico: pmmunnoz@cita-aragon.es

d) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad

Nombre y apellidos: José Vicente Lacasa Azlor  
NIF: 17978650-X  
Cargo: Director Gerente  
Tel: 976 71 65 50  
Fax: 976 71 63 35  
Correo electrónico: direccion.cita@aragon.es

e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto

Pilar María Muñoz Álvaro



## II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

### 1. Objetivo de la actividad:

Obtención de vacunas atenuadas frente a la brucelosis animal

### 2. Duración prevista de la actividad:

3 años (2015-2018)

## III. EVALUACIÓN DE RIESGO

Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en el Anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo.

### 1. Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del: Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

#### a) Organismo receptor.

Bacteria: *Brucella suis* biovariedad 5

Taxonomía: Familia Brucellaceae; Género Brucella

Nombre común: B. suis

#### b) Organismo donante.

Escherichia coli

#### c) Inserto.

No procede

#### d) Vector.

Plásmido derivado del vector pJQK (ver más adelante en la sección tipo de vector empleado en el proceso de modificación). (Gene 1997 (202): 53-59)

#### e) Organismo modificado genéticamente resultante.

*Brucella suis* con una delección en el gen wadC.

#### f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

Como máximo, los mismos que los originados por la cepa receptora

#### g) Efectos para el medio ambiente.

*Brucella suis* no se multiplica fuera de sus huéspedes o de las condiciones de cultivo. Sí es capaz de sobrevivir en el ambiente en determinadas condiciones, pero no de forma indefinida.



2. Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 4 de la Directiva 2009/41/CE y, en caso de ser aplicable, otros sistemas de clasificación nacionales e internacionales existentes (por ejemplo, la Directiva 2000/54/CE sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo).

Tipo 3            x

3. Probabilidad de que se produzcan efectos nocivos y gravedad de los mismos, en función de: Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

- a) Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental).

No es previsible que el OMG objeto de estudio produzca efectos nocivos en la salud humana o animal, ni sobre el medio ambiente, dadas las condiciones de manipulación del mismo y las condiciones de confinamiento a las que es sometido en las instalaciones del CITA (ver punto 4).

- b) Concentración y escala utilizadas.

El proceso se realizará a escala experimental, por lo que la presencia del OMG de estudio no será de magnitud elevada. La concentración máxima de bacteria a manipular será de  $10^9$ UFC/mL en un volumen máximo de 5mL y  $10^5$ UFC/mL en un volumen total máximo de 15mL (distribuido en viales de 5mL).

- c) Condiciones de cultivo (se tendrá en cuenta el entorno potencialmente expuesto, la presencia de especies susceptibles, supervivencia del OMG y efectos sobre el entorno físico).

La cepa parental (organismo receptor) de este OMG es *Brucella melitensis*, una especie del género *Brucellae* que afecta de forma natural a rumiantes (principalmente ganado ovino, caprino y bovino), causando abortos, lesiones testiculares y problemas de fertilidad. En humanos produce una enfermedad que cursa normalmente con cuadros febriles, debilidad, artromialgia y fibromialgia.

El subcultivo de este OMG y la preparación de inóculos vacunales para los experimentos con ratones se realizará en el interior de cabinas de seguridad biológica, que a su vez se encuentran en un laboratorio y un animalario registrado (ES502970012005), con nivel de contención 3. Las dos instalaciones mencionadas tienen acceso restringido y disponen de sistema de ventilación controlada a través de filtros HEPA absolutos. Se respetarán las medidas preventivas recomendadas para la manipulación de microorganismos potencialmente patógenos. El almacenamiento y transporte de los productos conteniendo el OMG se hará en recipientes herméticos y respetando las medidas de confinamiento (los OMG se trasladarán entre el laboratorio y el animalario -situado a 200 metros- en cajas cerradas y debidamente acolchadas, para evitar la rotura de los viales).

Por todo ello, no es previsible que los cultivos de OMG produzcan efectos nocivos en el entorno físico ni en otras especies susceptibles.



4. Determinación de la clasificación y medidas de confinamiento definitivas y confirmación de su idoneidad:

El OMG objeto de estudio se obtiene a partir de una cepa parental de *Brucella suis*, especie declarada como agente biológico de tipo 3 según R.D. 664/97, de 12 de mayo sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Para la obtención del OMG, se realiza una delección en genes relacionados con la virulencia de la bacteria, por lo que el resultado esperado es una cepa de virulencia atenuada respecto a su parental. En caso de no lograrse la atenuación esperada, los efectos del OMG serían, como máximo, los mismos que los de la cepa parental.

Tanto los subcultivos como los inóculos del OMG se manipularán en el interior de cabinas de seguridad biológica (BIO-IIA, Telstar) situadas dentro del **Laboratorio de Microbiología** con nivel de contención 3 del Edificio I+D del CITA. Los ratones serán inoculados con el OMG también en el interior de una cabina de seguridad biológica (IBL-55, Indelab) y alojados jaulas cerradas, en el **Animalario registrado del CITA (ES502970012005)**.

Ambas instalaciones (se adjuntan los Partes B correspondientes) tienen acceso restringido (mediante puertas cerradas y carteles indicativos) y disponen de filtros HEPA absolutos para filtrar el aire que sale al exterior. La manipulación del OMG será siempre realizada por personal especializado y entrenado para el trabajo con este tipo de microorganismos y con animales de experimentación, provisto de los EPI adecuados (guantes de nitrilo, bata, gorro y calzas desechables, mascarar o mascarillas FFP3).

Todo el material contaminado es inactivado en autoclaves *in situ* y/o introducido en cubos de cierre hermético para su posterior eliminación por una empresa gestora autorizada. Los cadáveres de los ratones son introducidos también en cubos de cierre hermético y eliminados por la misma empresa gestora. Las aguas del **Laboratorio P3** son tratadas antes de su vertido final al colector general. **El animalario** dispone de un depósito aislado en el que se recogen las aguas para su posterior tratamiento.

El OMG se almacenará y transportará en sistemas herméticamente cerrados y aislados del entorno.

5. Determinación del riesgo en el caso de que se produzca una liberación accidental:  
Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.
- a) Información adicional relativa a la ubicación de la instalación (proximidad a fuentes de peligro potenciales, condiciones climáticas predominantes, etc.).

Las instalaciones donde se desarrollarán las actividades con el OMG no se encuentran próximas a fuentes de peligro potenciales y no se estiman peligros derivados de la ubicación de las mismas.

El **Laboratorio de Microbiología** de contención de nivel 3, en el que se cultivarán los OMG y se prepararán los inóculos vacunales, está localizado en el edificio I+D del campus del CITA (área suburbana). Este laboratorio dispone de sistemas automáticos de climatización (22-25°C), y está dotado de sistema de presión negativa y eliminación de aire con control microbiológico mediante filtros HEPA del 99,9% (ver Parte B correspondiente).





El **Animalario registrado (ES502970012005)**, en el que se alojarán los ratones inoculados con el OMG, está situado en un edificio aislado del campus del CITA (ver Parte B correspondiente). Esta instalación tiene el acceso restringido (mediante carteles indicativos y puertas cerradas con llave) y sistema de ventilación a través de filtros HEPA absolutos. La sala donde se alojan los ratones dispone de jaulas cerradas, cabina de seguridad biológica y mantiene las condiciones ambientales controladas según legislación de protección de animales de experimentación ( $T^a$ : 20-24 °C, Humedad relativa: 40-70%).

Las posibilidades de una liberación accidental en las instalaciones descritas son mínimas debido a los equipos y sistemas de aislamiento empleados para la manipulación de los OMG y a los protocolos establecidos para la eliminación de los residuos, que son inactivados (por autoclavado, baño con propanol o tratamiento de aguas residuales) y/o eliminados por la empresa gestora autorizada para el tratamiento de residuos biológicos.

b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

El accidente en este caso se podría producir por derrame o por rotura de tubos que contengan el microorganismo, con improbable formación de aerosoles (ya que el volumen de solución bacteriana a manejar en cada actividad es bajo) o por pinchazos o cortes con material contaminado.

c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales (ver Partes B correspondientes)

- Cultivo del OMG, preparación de inóculos vacunales y manipulación de los ratones inoculados en el interior de cabinas de seguridad biológica disponibles tanto en el **Laboratorio de Microbiología P3** como en el **Animalario registrado (ES502970012005)** del CITA.
- El centro tiene asignado personal de mantenimiento adecuadamente formado para la vigilancia y control de las medidas de confinamiento y condiciones de climatización. Además, se dispone de termómetros visibles para el control de la temperatura por parte de los usuarios y manómetros para vigilar la presión de las salas sometidas a depresión y el adecuado funcionamiento de los filtros HEPA que filtran el aire de estas instalaciones antes de su salida al exterior.
- Se realiza la desinfección con autoclave disponible *in situ* o propanol de todo el material (sólido o líquido). Además, hay posibilidad de descontaminar las salas por nebulización con equipo portátil de formol-amoniaco si se considerase necesario.
- El personal dispone de los EPI adecuados (guantes, batas, calzas y gorros desechables, mascarar o mascarillas FFP3), ducha lavaojos, botiquín de primeros auxilios y fármacos.
- El laboratorio dispone de una ventana de observación para ver a sus ocupantes y de teléfono para mantener comunicación con el exterior.
- Los microorganismos viables se almacenan en un sistema cerrado aislados del entorno. El almacenamiento es cerrado y señalizado con el pictograma de riesgo biológico. Las neveras y congeladores donde se almacenan los OMG disponen de sondas de temperatura con sistema de alarma automatizado en caso de producirse una avería.



d) Planes de emergencia (para actividades tipo 3 y 4).

El Plan de Actuación ante Emergencias de los laboratorios P3 se integra en el Plan de Autoprotección del Edificio I+D, del cual forman parte. Este edificio es de uso compartido entre el CITA y el Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Gobierno de Aragón. En la recepción del edificio se encuentra el protocolo de actuación en caso de emergencia de este edificio, el listado de las personas responsables en caso de emergencia, los formularios para el control de la evacuación del edificio y los números telefónicos útiles en caso de emergencia (ver Parte B correspondiente).

El Plan de Emergencia del Animalario ha sido elaborado por MAZ Prevención (sociedad de prevención de la mutua MAZ). En la puerta de entrada y salida de la instalación se encuentra colgado de forma visible el protocolo de actuación en caso de emergencia, el listado de las personas responsables y los números telefónicos útiles en caso de emergencia (ver Parte B correspondiente).

Ante accidentes derivados de estas actividades se tomarán las siguientes medidas:

a) En caso de rotura de viales o jeringas:

- Cubrir los derrames con exceso de producto desinfectante (propanol), dejar actuar durante 30 minutos antes de limpiar con papel absorbente y desechar los residuos en cubo con cierre hermético (proporcionado por la empresa autorizada para la gestión de residuos biológicos).

b) En el caso de accidente físico:

- Exposición ocular a aerosoles o salpicaduras:

Lavar al menos 15 minutos con agua.

Acudir al hospital para evaluación y tratamiento.

- Exposición a agujas o material punzante.

Lavar cuidadosamente la zona herida con agua corriente sin restregar

Dejar manar la sangre durante 2-3 minutos (inducir el sangrado)

Desinfectar la herida con povidona yodada (u otro desinfectante)

Cubrir la herida con un apósito impermeable

En caso de herida grave, acudir al hospital para evaluación y tratamiento.

En caso de producirse una infección se tratará al paciente con estreptomina (15 días) combinada con doxiciclina (45 días).