



**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: FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Dirección postal: Decanato. Facultad de Medicina. C/ Arzobispo Morcillo. Nº 4. 28029 (Madrid)

a) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Pablo Rubio Garrido

NIF: Q2818013A

Cargo: Secretario Académico de la Facultad de Medicina/Delegado del Decano para asuntos de seguridad de la F. Medicina

Tel: 91 497 5303

Fax:

Correo electrónico: secretario.medicina@uam.es

b) Responsable científico de la actividad

[Redacted]

c) Responsable de bioseguridad de la instalación

Nombre y apellidos: Vicerrector@ de Investigación de la UAM

NIF: Q2818013A

Cargo: Presidente del Comité de ética de la investigación UAM

Fax:

Correo electrónico: comite.eticainvestigacion@uam.es

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

[Redacted]



- 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 ☐ NO ☒

Se va a solicitar un proyecto del Plan Estatal para la ejecución de esta actividad

- 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:

La finalidad de la actividad es trabajar con mutantes en los genes *recA*, *whiB3* de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Los mutantes se obtendrán comercialmente.

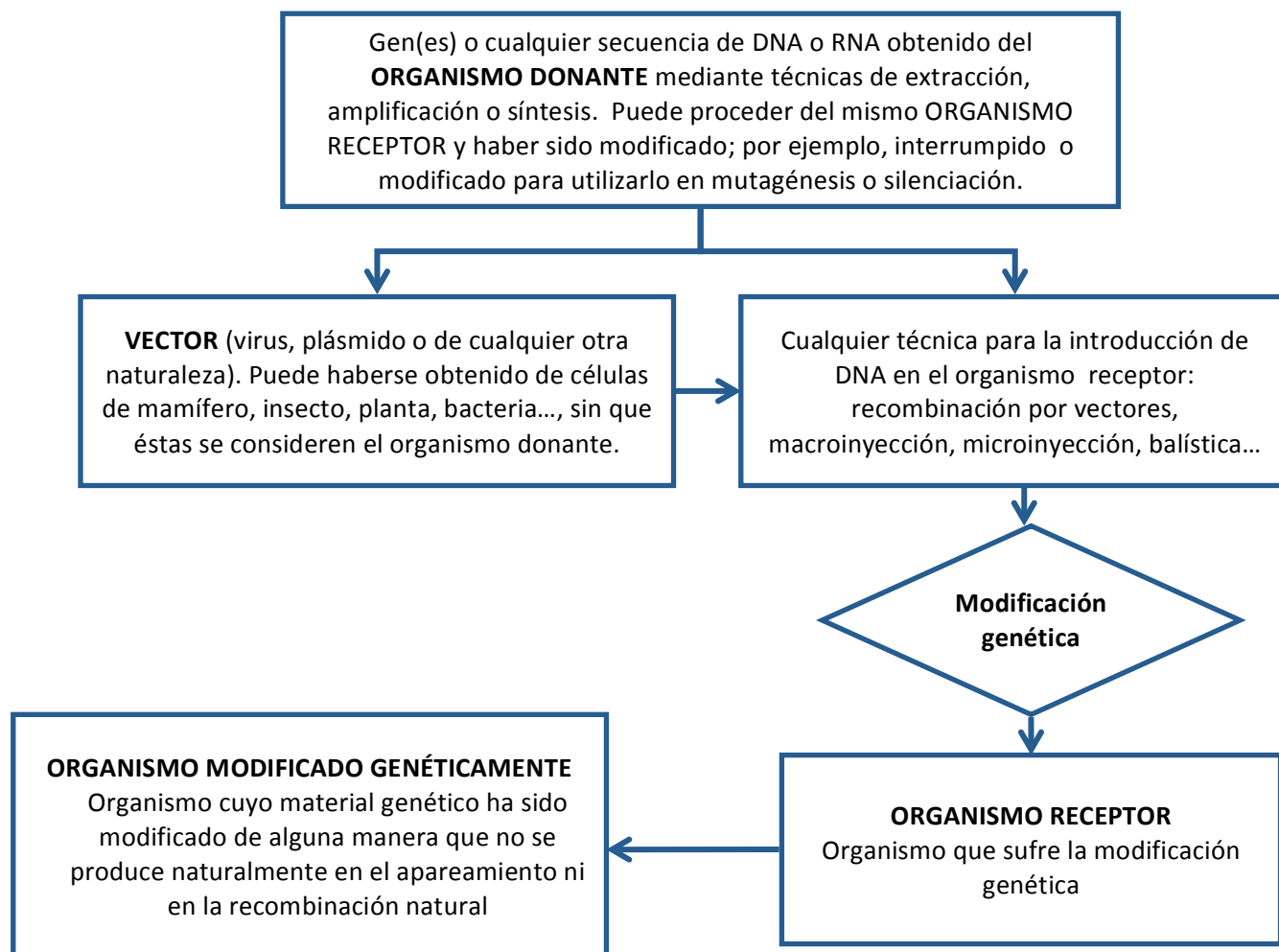
Los mutantes que se quieren adquirir son dos: mutante en el gen *recA* y mutante en el gen *whiB3*. Ambos genes están relacionados con estudios que se vienen realizando en el laboratorio desde hace años, y que se refieren a la infección latente y a la persistencia en presencia de antibióticos, aspectos que participan en el estado silente de este microorganismo en el hospedador humano. Con la adquisición de los mutantes se pretende entender mejor estos mecanismos patogénicos y de mantenimiento en el hospedador sin causar sintomatología por parte de la bacteria, que es el estudio que se plantea en este proyecto

- 2) Clasificación de la actividad

Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y 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 del riesgo.

Tipo 1 ☐
Tipo 2 ☐
Tipo 3 ☒
Tipo 4 ☐

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:

Nombre científico: *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551

Taxonomía: Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Corynebacteriales; Mycobacteriaceae; *Mycobacterium*; *Mycobacterium tuberculosis* complex

Nombre común: *Estirpes silvestres de Mycobacterium tuberculosis*

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

Cultivo en medios líquidos y sólidos. Se emplea, para el mantenimiento de las

bacterias, medios específicos de micobacterias, medio líquido Dubos o Middlebrook 7H9 y medio sólido Middlebrook 7H10, enriquecidos con Albúmina, ADC (albumina, dextrosa, catalasa) y OADC (ácido oleico, albumina, dextrosa, catalasa) respectivamente.

Para el estudio de latencia se emplean los medios líquidos con ácidos grasos de cadena larga como única fuente de carbono. En el estudio de persistencia se usan los medios estándares con adición de antibióticos en concentraciones bactericidas.

b) Técnicas de identificación:

Técnicas estándares de tinción específica de ácido-alcohol resistencia así como amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA.

c) Marcadores genéticos:

Secuencia específica del gen 16SrRNA del *Mycobacterium tuberculosis* complex, y otras secuencias específicas como el pre-rRNA y los genes *rpoB* y *hsp65*. La diferenciación de *M. tuberculosis* de otros miembros del complejo se realiza por multiplex PCR.

d) Marcadores fenotípicos:

No se emplean marcadores fenotípicos en la diferenciación de *M. tuberculosis*

e) Estabilidad genética:

Es un organismo muy estable desde el punto de vista genético. Presenta una baja variabilidad genética entre cepas y bajo nivel de intercambio genético con otras bacterias.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

No tiene

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

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:

Es una bacteria patógena para humanos, pero otros miembros del complejo pueden ser patógenos en humanos y en algunos animales. Solo es infectivo en su forma viva.

6) Si el organismo receptor 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.):

Grupo de Riesgo nivel 3



a) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

Da lugar a una patología frecuentemente respiratoria, con deterioro de las funciones pulmonares debido a la formación de lesiones granulomatosas denominadas tubérculos. Se manifiesta, por lo tanto, con síntomas respiratorios, como tos hemoptoica y dificultad al respirar, febrícula, malestar general y cansancio.

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

SI ☐ NO ☒

Porqué: En los estudios que se plantean se podrá determinar posible asociación con la patogenicidad en dependencia de los resultados de adaptación a la latencia de los mutantes (situación menos patógena) o no.

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

Sí, puesto que se trata de un preparado comercial previamente purificado, que garantiza la ausencia de agentes contaminantes.

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

El grupo tiene amplia experiencia en técnicas de Biología Molecular trabajando con este patógeno y especies relacionadas.

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?:

Sí. La vida media calculada de *M. tuberculosis* fuera del huésped es variable dependiendo de las condiciones que se apliquen, desde 20 min a 6 h según el estudio. Es muy sensible a la luz del sol con una vida media de 2-10 min en estas condiciones.

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

- | | | |
|------|----------------------------|--------------------------|
| i) | esporas | ☐ |
| ii) | endosporas | ☐ |
| iii) | quistes | ☐ |
| iv) | esclerocios | ☐ |
| v) | esporas asexuales (hongos) | ☐ |
| vi) | esporas sexuales (hongos) | ☐ |
| vii) | otros, especifíquese | ☐ |

No se conoce que genere formas de resistencia



c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

Es un organismo bastante resistente a factores medioambientales, aunque, como se ha mencionado anteriormente, es muy sensible a la luz UV.

d) Posibles nichos ecológicos:

Únicamente se le ha aislado del ser humano como hospedador, aunque sobrevive en aerosoles o en material contaminado durante un tiempo desconocido.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica, no se ha aislado nunca en ecosistemas naturales diferentes del ser humano.

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

No aplica.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

No aplica, solo otros miembros del complejo pueden causar tuberculosis en animales.

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

Ecosistema único es el ser humano. Es un organismo ubicuo a nivel poblacional mundial.

12) Hábitat natural del organismo:

Es un patógeno cuyo hábitat natural es el ser humano, se transmite entre individuos mediante aerosoles. En el medio ambiente, es capaz de sobrevivir y es infeccioso durante un tiempo, pero incapaz de crecer y dividirse.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: No aplica

Taxonomía: No aplica

Familia: No aplica

Género: No aplica

Especie: No aplica

Nombre común: No aplica



2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

No aplica

3) Método de obtención:

a) Extracción ☐

b) PCR ☐

c) Síntesis *in vitro* ☐

4) Función del gen/genes en el organismo donante

No aplica

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

SI ☐ NO ☐

No aplica

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i)	seres humanos	☐
ii)	animales	☐
iii)	plantas	☐

b) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

No aplica

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

No aplica.

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

No aplica

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

Los OGM a utilizar se obtendrán de la colección de mutantes de *M. tuberculosis* CDC1551 creada por TARGET (Tuberculosis Animal Research and Gene Evaluation)



Taskforce) que es parte del NIH/NIAID de la Universidad Johns Hopkins (USA) (<http://webhost.nts.jhu.edu/target/Default.aspx>).

Actualmente los mutantes se distribuyen en BEI Resources (Supporting Infectious Diseases Research <https://www.beiresources.org/BEIMutantSearch>).

1) Tipo de modificación genética:

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| a) Inserción de material genético | ☒ |
| b) Delección de material genético | ☐ |
| c) Sustitución de bases | ☐ |
| d) Fusión celular | ☐ |
| e) Otros, especifíquese | |

2) Finalidad de la modificación genética:

Eliminar, en dos mutantes diferentes, la función de los genes *recA* (gen relacionado con la regulación de la reparación de nucleótidos necesaria durante la respuesta SOS) y *whiB3* (relacionado con la regulación redox y con mecanismos de transcripción asociados a la fase de crecimiento de la bacteria).

El objetivo es conocer los cambios a nivel genético y fisiológico que se producen en los mutantes, en condiciones que asemejan la latencia y la persistencia bacterianas. El estudio permitirá determinar la función de cada uno de estos genes en latencia y persistencia de la tuberculosis.

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

El proceso de modificación genética se ha realizado utilizando mutagénesis por transposición al azar. El punto de partida es el transposón *Himar1* (Lampe *et al.* 1999) aislado de la mosca *Haematobia irritans*, que muestra unos niveles de transposición aumentados en diez veces respecto a otros sistemas, mejorando de esta forma la eficiencia en la transposición y creación de mutantes. Se utiliza para preparar bancas de mutantes por tener una diana corta (AT) lo que posibilita que pueda insertarse en muchos sitios diferentes en el genoma y en un amplio rango de microorganismos (Lamichhane *et al.* 2003).

A partir de *Himar1*, se construyó el *phagemid* ϕ MycoMarT7 (Sasseti *et al.* 2001).

La construcción de mutantes en *M. tuberculosis* se realizó en la cepa CDC1551 utilizando como vehículo el *phagemid* ϕ MycoMarT7 (Sasseti *et al.* 2001). Los *phagemid* son construcciones para la manipulación de genes que tienen la capacidad de crecer como fago y como plásmido, suelen tratarse de elementos *shuttle*, esto es, replican tanto en *E. coli* como en micobacterias.

Los sitios de mutación por inserción se identificaron mediante PCR con iniciadores específicos del transposón (Lamichhane *et al.* 2003).

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

SÍ ☒ NO ☐

En caso afirmativo:

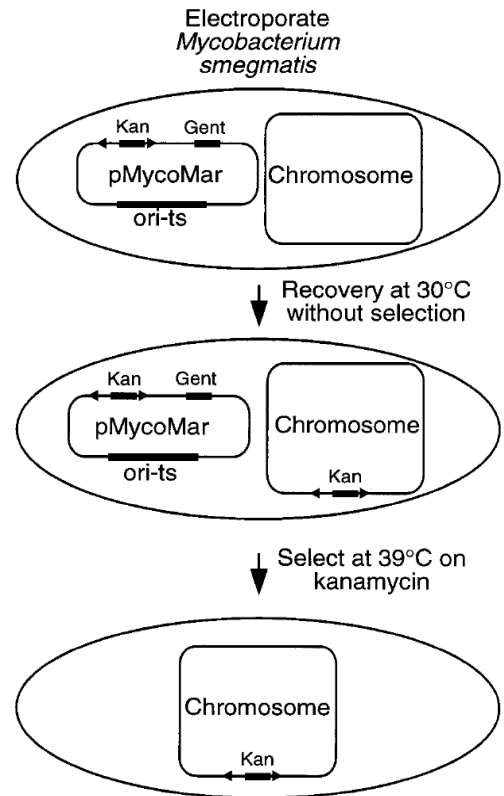
Figura 3 tomada de Rubin *et al.* 1999

a. Tipo e identidad del vector:

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 1647

Se utiliza el *phagemid* ϕ MycoMarT7, que presenta las siguientes características (Siegrist & Rubin, 2008):

- Un cassette de resistencia a kanamicina que permite la selección de mutantes
- Un bacteriófago sensible a la temperatura. Se trata del fago defectivo ϕ AE87. Debido a que no puede replicar ni integrarse en el genoma, el fago siempre se pierde tras la transposición.
- El gen de la transposasa está codificado externamente al transposón. Por tanto, una vez que ocurre la transposición el gen de la transposasa se pierde con el fago vector. En consecuencia, el elemento integrado es incapaz de transponerse a otra localización del cromosoma. Este gen está bajo el control del promotor T6, un promotor que es funcional en micobacterias pero no funciona en *E. coli*.
- Extremos invertidos repetidos para el reconocimiento de la transposasa.
- El origen de replicación de *E. coli*, oriR6K, que posibilita la manipulación genética en esta bacteria modelo.
- Dos promotores T7 en dirección hacia el exterior que posibilitan realizar transcripción *in vitro* de las regiones cromosómicas adyacentes.



La figura muestra el funcionamiento del plásmido pMycoMarT7, precursor de ϕ MycoMarT7 utilizado en micobacterias. Para construir ϕ MycoMarT7, el plásmido pMycoMarT7 conteniendo estos elementos, así como las secuencias del sitio cos de fago λ , se clonaron en el fago ϕ AE87 (Sasseti *et al.* 2001).

Al igual que pMycoMar, la replicación de ϕ MycoMar es sensible a la temperatura, ocurre a 30°C pero no a 39°C. Para la selección de los mutantes, las micobacterias se crecen una noche a 30°C para permitir la transposición. Posteriormente se plaquean en medio con kanamicina a 39°C, lo que impide la replicación del plásmido.

Las colonias que sobreviven a esta temperatura son sensibles a gentamicina, característica que se emplea para seleccionar, también en presencia de Kanamicina, las colonias con transposición en el cromosoma y que han perdido el plásmido.

b. Si se trata de un virus:

Es defectivo en replicación

SÍ



NO



Se utilizan derivados de un fago no replicativo, para evitar la lisis de la célula receptora (Hatfull, 2000). La replicación de ϕ MycoMarT7 es dependiente de la temperatura, como la del plásmido del que procede.

- 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):

Las características de la región del inserto se explican en el apartado 5.
Otros componentes del vector son los siguientes:

No está accesible la secuencia de ϕ AE87. En todo caso, se elimina tras la transposición no permaneciendo en los mutantes,

La Figura siguiente muestra la estructura de la transposasa usada en este sistema. La secuencia codificante de la transposasa también se pierde tras la transposición.

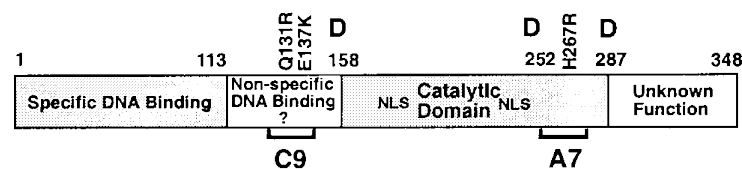


Figura 1, tomada de Lampe *et al.* 1999

En relación con la transposasa, a partir del primer nucleótido, empieza el sitio de unión a DNA, identificado en base a análisis comparativo de secuencia con otras transposasas. Las letras "D" en la figura 1 indican posiciones de los residuos catalíticos. Las regiones NLS, en el dominio catalítico, se refieren a señales de localización nuclear (Lampe *et al.* 1999).

En la construcción de los mutantes que se pretende solicitar, se usa la variante C9 de la transposasa, que muestra mayor actividad. Como se indica en la figura, esta variante posee cambios en los siguientes aminoácidos: Q131R y E137K.

Secuencia de nucleótidos de la transposasa C9 de *Himar1* (1146nt)

```

atggaa aaaaaggaat ttctgtgttt gataaaatac tgttttctga agggaaaaaa
tacagtggaa gcaaaaactt ggcttgataa tgagtttccg gactctgccc cagggaatc
aacaataatt gattggtatg caaaattcaa gcgtggtgaa atgagcacgg aggacggtga
acgcagtgga cgcccgaaag aggtggttac cgacgaaaac atcaaaaaaa tccacaaaat
gattttgaat gaccgtaaaa tgaagttgat cgagatagca gaggccttaa agatatcaaa
ggaacgtgtt ggtcatatca ttcatacaata tttggatatg cggaagctct gtgcgaaatg
ggtgccgcgc gagctcacat ttgacaaaaa acaacgacgt gttgatgatt ctaagcgggtg
tttgcagctg ttaactcgta atacaccoga gtttttccgt cgatatgtga caatggatga
aacatggctc catcactaca ctcttgagtc caatcgacag tcggctgagt ggacagcgac
cggatgaaccg tctccgaagc gtggaaagac tcaaaagtcc gctggcacaag taatggcctc
tgtttttttg gatgcgcgat gaataatttt tatcgattat cttgagaagg gaaaaacat
caacagtgcac tattatatgg cgttattgga gcgtttgaag gtcgaaatcg cggcaaaacg
gccccacatg aagaagaaaa aagtgttggt ccaccaagac aacgcaccgt gccacaagtc
attgagaacg atggcaaaaa ttcatagaatt gggcttcgaa ttgcttcccc acccgccgta

```



```
ttctccagat ctggcccccga ggcacttttt cttgtttctca gacatcaaaa ggatgctcgc  
agggaaaaaaa tttggctgca atgaagaggt gatcgccgaa actgaggcct attttgaggc  
aaaaccgaag gactactacc aaaatggtat caaaaaattg gaaggctcgtt ataatcgttg  
tatcgctctt gaagggaact atgttgaata a
```

Secuencia de aminoácidos de la transposasa C9 de *Himar1*. Se destacan en negrita y color rojo los aminoácidos modificados en la variante C9.

"MEKKEFRVLIKYCFLKGKNTVEAKTWLDNEFPDSAPGKSTIIDWYAKFKRGEMSTED
GERSGRPKEVVTDENIKKIHKMILNDRKMKLIEIAEALKISKERVGHIIHQYLDMRKLCAK
WVPRELTFDQKQ**R**RVDDS**K**RCLQLLTRNTPEFFRRYVTMDETWLHHYTPESNRQSA
EWTATGEPSPKRGKTQKSAGKVMASVFWDAHGIIFIDYLEKGKTINSDDYIMALLERLK
VEIAAKRPHMKKKKVLHFDNAPCHKSLRTMAKIHGELGFELLPHPPYSPDLAPSDFFLF
SDIKRMLAGKKFGCNEEVIAETEAYFEAKPKEYYQNGIKKLEGRYNRCIALEGNYVE"

d. Gama de hospedadores del vector:

Se ha visto que funciona en organismos procariotas y eucariotas.

e. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

Posee una transposasa, pero esta se encuentra fuera de la región que se inserta en el cromosoma, lo que evita la movilización de la región insertada. Se ha descrito que la frecuencia de reversión de las mutaciones es baja, ya que la frecuencia de excisión precisa del transposón con la restauración de la función del gen mutado es baja (Bardarov *et al*, 2001).

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

Si, el fago empleado no posee capacidad lisogénica.

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

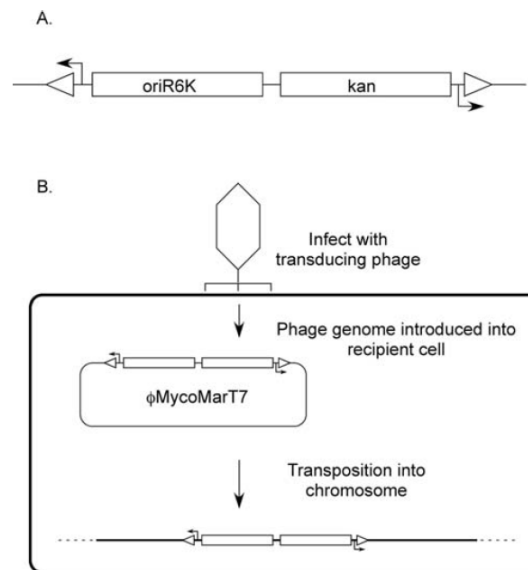
Potencialmente si, dado que posee el gen de resistencia a kanamicina.

5) Información del inserto:

Los organismos modificados genéticamente presentan una inserción en los genes diana de interés (*recA* y *whiB3*), con la consecuente falta de actividad de los mismos. Según los estudios realizados, ninguno de los dos genes es esencial, por lo que la bacteria se mantiene viable a pesar de carecer de ambas funciones (Sasseti & Rubin, 2003).

Con los OMGs se estudiará la función de esos genes en el fenotipo silente (persistente y latente) del patógeno. Los datos previos indican que todos ellos participan en la entrada en el fenotipo silente, por lo que su inactividad nos informará de la función que realizan cada uno de los genes en estas condiciones.

El objetivo final es determinar si dichos genes pueden ser diana para el tratamiento de la infección latente tuberculosa.



La figura muestra un esquema representativo del mecanismo de inserción de ϕ MycoMarT7. Tomada de Siegrist & Rubin (2009).

Fig. 21.1 A, representación de ϕ MycoMarT7 showing the kanamycin gene, inverted repeats, T7 promoters, and *E. coli* oriR6 K origin of replication. B, representación of transduction

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

Dimensiones:

El inserto tiene una longitud de 2064 nucleótidos.

Mapa de restricción:

El mapa de restricción se muestra en el Anexo I.

Secuencia:

GenBank: AF411123.1

```

1      taacagggttg gctgataagt ccccggtctc tagacccta tagtgagtcg tattacaaac
61     tggacaaca ctcaacccta tctcgggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat
121    ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa ttttaacgca attttaacaa
181    aatattaacg cttacaattt aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccagatcc
241    ccacgatgcg tccggcgtag aggatctgaa gatcagcagt tcaacctgtt gatagtacgt
301    actaagctct catgtttcac gtactaagct ctcatgttta acgtactaag ctctcatgtt
361    taacgaacta aaccctcatg gctaacgtac taagctctca tggctaacgt actaagctct
421    catgtttcac gtactaagct ctcatgtttg aacaataaaa ttaatatataa tcagcaactt
481    aaatagcctc taaggtttta agttttataa gaaaaaaaaa aatatataag gcttttaaa
541    cttttaaggt ttaacgggtt tggacaacaa gccagggatg taacgcactg agaagccctt
601    agagcctctc aaagcaattt tcagtgcac aggaacactt aacggctgac agaattcttg
661    aagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga taataatggt
721    ttcttagacg tcagggtggca cttttcgggg ttataagggc tgcaggaatt cgatatcaag
781    cttatcgata ccgtcgacct cgaggggggg cccggtaccg aggacgcgtc gaattaattc
841    cgctagcttc acgctgccgc aagcactcag ggcgcaaggg ctgctaaagg aagcgggaaca
901    cgtagaaagc cagtccgcag aaacggtgct gaccccgcat gaatgtcagc tactgggcta
961    tctggacaag ggaaaacgca agcgcgaaaga gaaagcaggt agcttgcagt gggcttacat
1021   ggcgatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg ccagctgggg

```

```

1081 cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaactg gatggctttc ttgccgcaa
1141 ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga tcgtttcgca
1201 tgattgaaca agatggattg cacgcagggt ctccggccgc ttgggtggag aggctattcg
1261 gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc cgccgtgttc cggctgtcag
1321 cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg aatgaactcc
1381 aagacgaggg agcgcgggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc
1441 tcgacgttgt cactgaagcg ggaaggggact ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg
1501 atctcctgtc atctcacctt gtcctgccg agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc
1561 ggcggttgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg aaacatcgca
1621 tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat ctggacgaag
1681 agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccagggt caaggcgcg atgcccgacg
1741 gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg
1801 gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca
1861 tagcgttggc taccgtgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttc
1921 tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcat cgccttctat cgccttctg
1981 acgagttctt ctgagcggga ctctggggta cgcgtaatac gactcactat agggctctag
2041 gaccggggac ttatcagcca acctgtta //

```

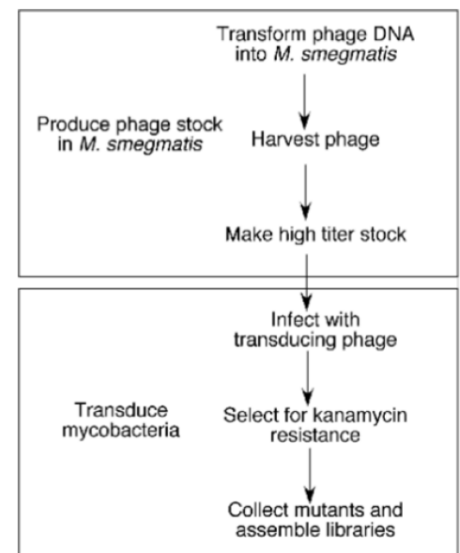
b) Origen y función específica de cada parte del inserto:

- Región “ta” en color rojo identifica el dinucleótido repetido del sitio de inserción
- Regiones destacadas en verde identifican la región invertida repetida de *Himar1*.
- Regiones 22 a 55 y 2015-2034, identifican dos copias del promotor T7
- Región 29-760, origen de replicación del plásmido R6K de *Escherichia coli*.
- Región 1200-1994, gen de resistencia a kanamicina

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

La realización de la transducción se describe en forma detallada en Siegrist y colaboradores (2009). Debe prepararse inicialmente un stock de *phagemid* en *E. coli*. Los cultivos de micobacterias en medio líquido se crecen en hasta una densidad óptica de 0,8-1,0 a 600nm. Las bacterias se recogen y se resuspenden en un buffer que contiene SO₄Mg y Cl₂Ca. Las células se infectan con el *phagemid* a una concentración elevada y se incuban durante 3-4 horas a 37°C. Las bacterias se incuban en medio sólido a 37°C, seleccionando los mutantes en presencia de kanamicina.

La figura muestra una representación esquemática de la preparación del *phagemid* y la transformación en micobacterias. Figura tomada de Siegrist & Rubin (2009).



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

Gen de resistencia a kanamicina.

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



Contiene dos copias de secuencias promotoras T7.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Si, número de accesoión GenBank: AF411123.1

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.

Si, hay una región sin función asignada entre los nucleótidos 761 y 1199.

VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?

No, las modificaciones están integradas de forma estable en el cromosoma de *M. tuberculosis*.

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?

El material genético está integrado en las dianas que se indican a continuación en el genoma de *M. tuberculosis* (apartado b, iii).

En caso afirmativo:

i) número de copias:

Hay una copia del material integrado por cromosoma en cada mutante.

ii) localización cromosómica:

Mutante JHU2737c-552, con punto de inserción en el nucleótido 552 de la región codificante del gen *recA* (tamaño del gen-2373 nucleótidos). Coordenadas del gen *recA* en el cromosoma de *M. tuberculosis*: 3049052 – 3051424.

Mutante JHU3416-307, con punto de inserción en el nucleótido 307 de la región codificante del gen *whiB3* (tamaño del gen-309 nucleótidos). Coordenadas del gen *whiB3* en el cromosoma de *M. tuberculosis*: 3834892 – 3835200.

iii) secuencias colindantes:

Se indica la secuencia de cada gen, identificando el sitio de inserción del elemento transponible. Las secuencias colindantes son intragénicas en ambos casos.

```
>M. tuberculosis H37Rv|Rv2737c (recA)
atgacgcagacccccgatcgggaaaaggcgtcgcagctggcagtgggccagatcgagaag
agttacggcaaaggttcggtgatgcgcctcggcgacgaggcgcgtcagccgatttcggtc
attccgaccggatccatcgcaactagacgtggccctgggcattggcggcctgccgctggc
cgggtgatagagatatagcggccggagtcgtcgggtaagaccaccgtggcgtgcacgcg
gtggccaacgctcaggccgcccgtggtgttcggcggttcacgcagccgagcacgcgtg
gatccggactatgccagaagctcgggtgtcgacaccgattcgtgctggtcagccagccg
gacaccggggaacaggcactcgagatcgccgacatgctgatccgctcgggtgcgcttgac
atcgtggtgatcgactcgggtggcggcgctggtgccgcgcgcggagctcgaaggcgagatg
ggcgacagccac  gtcgggctgcaggcccggtgatgagccaggcgctgc
ggaaaatgaccggcgcgctgaataattcgggcaccacggcgatcttcatcaaccagctcc
gcgacaagatcggagtgatgttcgggtcgcccgagacgacaacgggcgaaaggcgttga
agttctacgcgtcgggtgcgcattggacgtgcggcgagtcgagacgctcaaggacggtacca
acgcggtcggcaaccgcaccgggtcaaggtcgtcaagaacaagtgcctcgcagagggca
ctcggatcttcgatccgggtcaccgggtacaacgcacgcacgcagagatggttgcgatgggc
gcaagcctattcatgtcgtggctgctgccaaaggacggaacgctgcacgcggcccggtgg
tgtcctggttcgaccagggaacgcgggatgtgatcgggttgcgatcgccggtggcgcca
tcgtgtgggcgacaccgatcacaaggtgctgacagagtacggctggcggtgcgcggggg
aactccgcaagggagacaggggtggcgcaaccgcgacgcttcgatggattcgggtgacagtg
cgccgattccggcggtatcatgcccggtgcttgggtacctgatcggagatggcagggatg
gttgggtggggggcaagactccgatcaacttcacatgttcagcgggcgctcattgacg
acgtgacgcgaatcgctgcgacgctcgggtgcgcggcccatccgcagggggcgatctcac
tcgcgatcgctcatcgaccgggtgagcgcaacgggtgtggcgagacctttgtcagcaggccg
gtatctacggcaagctcgctgggagaagacgattccgaattggttcttcgagccggaca
tcgcggccgacattgtcggcaatctgctcttcggcctgttcgaaagcgacgggtgggtga
gccgggaacagaccggggcacttcgggtcgggttacacgacgacctctgaacaactcgcg
atcagattcattggctgctgctgcgggttcgggtgtcgggagcaccggttcgagattacgatc
cgaccagaagcgccgagcatcgtaacgggtcgacggatccagagcaaacgtaagtggt
tcgaggtccggatctcgggtatggataacgtcacggcattcgcggagtcagttcccatgt
ggggggcgcgcggtgccgcgcttatccaggcgattccagaagccacgcagggggcgcgctc
gtggatcgcaagcgacatatctgggtgcagagatgaccgatgccgtgctgaattatctgg
acgagcgcgcggtgaccgcgcaggaggccgcggccatgatcgggtgtagcttccggggacc
cccgcggtggaatgaagcaggtcttaggtgccagccgccttcgtcgggatcgcggtgcagg
cgctcgcggtatgccctggatgacaaattcctgcacgacatgctggcggaagaactccgct
attccgtgatccgagaagtgcgtgccaaacgcggcgggcacgaacgttcgacctcgaggtcg
aggaactgcacaccctcgtcgccgaaggggttgcgtgcacaactgttcgcccccttca
agcaggccgagttcgacatcctctacggcaaggggaatcagcagggagggtcgtgatcg
acatgggtgtggatcagggcctcatccgcaagtcgggtgcctggttcacctacgagggcg
agcagctcggccagggcaaggagaatgcccgcaacttcttgggtggagaacgccgacgtgg
ctgacgagatcgagaagaagatcaaggaaaagcttggcattgggtgccgtgggtgaccgatg
atccctcaaatgacgggtgcctgccccgccccgctcgacttctga
```

```
>M. tuberculosis H37Rv|Rv3416 (whiB3)
atgccacagccggagcagctaccgggacccaacgcagacatctggaactggcaattgcaa
ggcctgtgtcgcggcatggactcatcgatgttcttccatcccgacggcgagcgtggccgt
gcccgaacgcagcgcgaacaacgcgccaaggaaatgtgtcggcgctgccccgtgatcgag
gcgtgccgatcccatgcgttagaggtcggtagccctatggcggttgggggtggcctgtcc
```



gaatccgagcgcgcacctactcctcaagggcaccatgggacgcacccgcggcatccgccgcacagctt
↔ aa

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

El gen *recA* codifica para la recombinasa A, influye sobre los componentes de la respuesta SOS de la bacteria, cataliza la hidrólisis de ATP en presencia de DNA de cadena simple como indicador de stress, y también interacciona con el gen LexA (Rv2720) causando su inactivación. Su inactivación afectaría todas esas funciones.

El gen *whiB3* es una proteína que contiene el anillo hemo, que parece actuar como anillo sensor, mediante el cual está relacionada con el control del equilibrio redox intrabacteriano. No se conocen en detalle los miembros de su regulón. Su inactivación influiría sobre los miembros de dicho regulón. Su actividad se induce cuando la bacteria esta en hipoxia y en presencia del ácido nítrico, ambos factores relacionados con latencia. En la infección en macrófagos se sabe que el gen regula el metabolismo lipídico de la bacteria, en respuesta al sistema redox puesto en marcha durante la infección, lo cual permite su mantenimiento viable intracelular (Singh et al, 2009).

c) Si se trata de un virus:

Se trata de un *phagemid*. La inserción se produce en el dinucleótido TA.

- i) La inserción es específica ☐
ii) La inserción se produce al azar ☒
iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas ☐

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

No se ha detectado expresión de los genes diana.

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

Se han realizado estudios de transcriptómica utilizando microarrays (Lamichhane *et al.* 2005) así como hibridación específica del sitio de transposición (TraSH) (Sasseti & Rubin 2003).

Aportar toda la documentación al respecto.

Se adjuntan documentos de las siguientes referencias:

- Badarov S. *et al.* PNAS 94:10961-10966. 2001.
- Glickman MS. in Molecular Genetics of Mycobacteria (2nd Edition), eds. Hatfull, G. F. & Jacobs, W. R. J. (Am. Soc. Microbiol. Press, Washington, DC), pg. 657-666. 2014.
- Hatfull, G. F. in Molecular Genetics of Mycobacteria, eds. Hatfull, G. F. & Jacobs, W. R. J. (Am. Soc. Microbiol. Press, Washington, DC), pg. 37-54. 2000.
- Lamichhane G. *et al.* PNAS 100:7213-7218. 2003.
- Lamichhane G. *et al.* Infection & Immunity 73:2533-2540. 2005
- Lampe DJ. *et al.* PNAS 96:11428-11433. 1999.



- Manganelli R. in Molecular Genetics of Mycobacteria (2nd Edition), eds. Hatfull, G. F. & Jacobs, W. R. J. (Am. Soc. Microbiol. Press, Washington, DC), pg. 137-160. 2014.
- Rubin EJ. *et al.* PNAS 96:1645-1650. 1999.
- Sassetti CM. *et al.* PNAS 98:12712-12717. 2001.
- Sassetti CM & Rubin EJ. PNAS 100:12989-12994. 2003.
- Siegrist MS & Rubin EJ. In Methods in Molecular Biology, eds. Parish, T. & Brown, A. C. (Humana Press, Totowa, NJ 2008), pg. 311-323. 2009.
- Singh A. *et al.* PLoS Pathogens 5 (8): e1000545. 2009.
- Szulc-Kielbik I. *et al.* FEBS Journal 282:1289-1306. 2015.

2) Características genéticas y fenotípicas modificadas del organismo receptor 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:

Se espera que los OMGs presenten diferencias fenotípicas respecto al organismo receptor, en condiciones de cultivo asociadas a persistencia (mutante *recA*) o bien en condiciones de cultivo asociadas a latencia (mutante *whiB3*).

Los estudios previos con mutantes en *whiB3* muestran fenotipo atenuado. La cepa mutante es capaz de alcanzar la misma carga bacteriana que la silvestre en modelos de infección de ratones y de cobayas, aunque mostrando menor patología a nivel de los órganos diana (Manganelli, 2014).

Mycobacterium tuberculosis realiza recombinación dependiente e independiente de *recA*. El mutante *recA* tiene elevada sensibilidad a la radiación ionizante, pero su fenotipo es, en general muy similar al de la cepa silvestre (Glickman, 2014). En infección de macrófagos, el mutante es capaz de reducir la capacidad bactericida de la célula, por lo que se infiere que este gen podría participar en el escape de la bacteria a la acción bactericida del fagocito (Szulc-Kielbik *et al.*, 2015).

- b) Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese:

El OMG *recA* presenta un crecimiento mas lento que la estirpe silvestre.
El OMG *whiB3* crece de forma deficiente en medio con acidos grasos de cadena corta, comparado con la estirpe silvestre.

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

Los OMG no son patogenos para plantas o animales y al no ser genes esenciales se sugiere que la influencia de las mutaciones sobre el fenotipo patógeno no sean importantes. Como se ha comentado, el mutante *whiB3* es atenuado en comparación con la cepa silvestre.

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



NO

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

Como se ha indicado, el mutante *whiB3* crece mal en medios con ácidos grasos de cadena corta. Su crecimiento está aumentado en medios con acetato respecto a la estirpe silvestre.

- f) Marcadores específicos del OMG:

Contiene el gen de resistencia a Kanamicina. La delección de cada gen se ha realizado en fase, con lo que la única diferencia de cada mutante con la estirpe silvestre es que carecen de los genes *recA* y *whiB3* respectivamente.

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

Los cambios son estables genéticamente

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

M. tuberculosis es un organismo considerado genéticamente aislado, con poca o nula transferencia de material genético entre cepas y a otros organismos.

- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.

- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.

Se utilizará PCR seguida de secuenciación para confirmar las mutaciones presentes en los genes *recA* y *whiB3* en cada mutante

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

Los OMGs se utilizará exclusivamente en el laboratorio de bioseguridad nivel 3. No se requiere aislamiento del medio ambiente

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

- 1) Naturaleza de las operaciones:

- a) Enseñanza ☐
- b) Investigación ☒
- c) Desarrollo ☐



2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

- a) Volumen máximo en el caso de microorganismos: 100 ml
- b) Número de plantas: No aplica
- c) Número de animales: No aplica

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

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

Estudiar dos mutantes con delección de genes relacionados con la persistencia y latencia de *Mycobacterium tuberculosis* y determinar la adaptación fenotípica y la actividad genética que realizan, para establecer el fenotipo silente.

Se espera encontrar marcadores que indiquen los procesos que pone en marcha la bacteria para establecer la infección latente, la más exitosa en el ser humano por su alta frecuencia.

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:

Los mutantes se distribuyen en BEI Resources (Supporting Infectious Diseases Research <https://www.beiresources.org/BEIMutantSearch>).

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 aplicable¹ (tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

Los OMGs deben transportarse desde su origen (ver web mencionada). El manejo, embalaje y etiquetado seguirá la normativa internacional y nacional vigente para el transporte de mercancías peligrosas y de sustancias infecciosas.

¹ 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.

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):

El manejo de células vivas de *M. tuberculosis* y los OMGs se realizará en un grado 3 de confinamiento y tendrá lugar en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

Estudio de latencia:

Las bacterias (OMGs y cepa silvestre) se crecerán en un volumen de 10ml según el procedimiento descrito por Rodríguez y colaboradores (2014), utilizando Middlebrook 7H9 como medio de cultivo, hasta alcanzar 0,5 UDO_{600nm} momento en que el pre-cultivo se divide en varios inóculos, uno de ellos se crece en 100ml del mismo medio y el otro en 100ml de una mezcla de ácidos grasos de cadena larga (AG-CL) y número par de átomos de carbono (ácidos oleico, palmítico y esteárico, 0,001% cada) como única fuente de carbono.

Se recogen cultivos en fase exponencial (Rodríguez *et al*, 2014), para obtener datos que servirán de referencia. Los cultivos en AG-CL se recogen también a los 30 y 60 días de incubación. La concentración máxima esperada en estos cultivos es de 0,9-1,0 UDO_{600nm}

Un lote de los cultivos que se llevan hasta los 30 días se divide en dos inóculos, uno de los cuales se somete al procedimiento clásico de hipoxia descrito por Wayne y Sohaskey (2001) hasta alcanzar la denominada fase NRP1. Para controlar el nivel de hipoxia de los cultivos, se realiza, en paralelo a estos, un cultivo suplementado con azul de metileno (1,5 mg/ml) que se usará como indicador del nivel de depleción de oxígeno.

Estudio de persistencia:

Las bacterias (OMGs y cepa silvestre) se crecerán en dos tubos con un volumen de 10-20ml de Middlebrook 7H9 como medio de cultivo, hasta alcanzar 0,5 UDO_{600nm}. Llegado este punto, a un tubo de cada cepa se le agrega el antibiotico a concentraciones bactericidas (entre 10 y 20 veces mayor que la CIM). El duplicado de cada aislamiento se mantiene como control sin agregar antibióticos. A los 2, 4, 7 y 14 días de agregados los antibióticos se toman muestras y se siembran en medio solido por duplicado para obtener colonias aisladas en tubos sin y con antibioticos. Las UFC se cuantifican a los 40 días de cultivo.

Para el estudio de los OMGs se adaptarán las condiciones de crecimiento activo descritas en medio estándar Middlebrook 7H9 (Benjack *et al*, 2016) al medio con AG-CL, mediante la realización de curvas de crecimiento y determinación del punto equivalente a crecimiento exponencial.

Cuando se recogen los cultivos, y previamente a la extracción del RNA total, se determinarán las unidades formadoras de colonias (UFC) y el número mas probable (NMP) (<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm109656>) este último procedimiento se recomienda cuando se esperan una cantidad pequeña de microorganismos, como puede ocurrir, particularmente en los cultivos en hipoxia.

Para evaluar los cambios en el fenotipo asociados a latencia y persistencia, se realizará tinción de ácido-alcohol resistencia estándar para determinar si esta característica se mantiene y tinción fluorescente de lípidos. Para esta última se utilizará la tinción doble Auramina-O-Rojo Nilo, según el protocolo descrito por Deb y colaboradores (2009), que se ha usado previamente en el laboratorio (Piñero *et al*, V Reunión SLAMTB. Zacatecas, Mexico. 2010), y que permite detectar y cuantificar la presencia de lípidos en el interior de las bacterias. Para la cuantificación de la fluorescencia se usará el software NIS-BR (Nikon). Finalmente, se determinará la posible tolerancia de las bacteria a partir de cultivos en lípidos de larga duración, utilizando los antimicrobianos y el procedimiento descrito

previamente determinándose las UFC y el NMP para valorar dicha tolerancia.

Para la extracción del RNA, las bacterias se lavarán con solución salina conteniendo Tween 80, y el reactivo *RNA protect reagent* de Quiagen. Seguidamente, las bacterias se lisan en presencia de fenol ácido y perlas de vidrio en el aparato Fast-Prep, mediante rotura mecánica, repitiendo todo el proceso tres veces. De los sobrenadantes obtenidos, se purifica el RNA con cloroformo, se precipita con isopropanol, se lava con etanol y se resuspende en agua tratada con DEPC. Posteriormente, se realiza un tratamiento con DNasa I, se vuelve a purificar con fenol-cloroformo y se cuantifica con el Nanodrop.

Las muestras de RNA serán enviadas a la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica (FISABIO) donde se llevará a cabo la eliminación del RNA ribosómico y la preparación de librerías para RNA-seq específico de hebra (*strand-specific* RNA-seq; ssRNAseq).

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

Todos los residuos biológicos que se generen serán inmediatamente inactivados dentro de los recintos de contención (cabinas de bioseguridad) mediante la utilización de germicidas de amplio espectro usados.

Posteriormente, los residuos líquidos y los sólidos se autoclavarán dentro del laboratorio de bioseguridad. Los procedimientos de autoclavado y esterilización por calor y químicos se validan periódicamente mediante la utilización de kits de esporas del microorganismo testigo *Bacillus stearothermophilus*.

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

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo a la Facultad de Medicina es bajo es bajo por las siguientes razones:

- El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos (Biowaste) y el sistema de esterilización de líquidos y sólidos (autoclave).

- La infraestructura y medios se valida periódicamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras tras averías. Igualmente, el servicio de Prevención de Riesgos Laborales validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

- La instalación dispone de un Manual de Bioseguridad y Reglamento de Funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de Prevención de Riesgos.

Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.

- La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que intenta cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencias.

- El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es bajo, la zona adyacente al mismo es solo utilizada por personal de laboratorio al tratarse de una entrada a

una cámara de refrigeración. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.

-La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid se encuentra aislada de zonas habitadas por tres de sus cuatro lados, estando el laboratorio situado en la parte interior de la misma, por lo que se encuentra separado de zonas habitadas que se sitúan en un ala separada de aquella donde se encuentra el laboratorio.

-No existen en las cercanías cultivos agrícolas, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

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:

Las operaciones indicadas se realizarán en laboratorio de nivel 3 de contención biológica con autorización Nº Registro IRSST 18/216905.9/10

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas a seguir serán las expuestas en el Manual de Bioseguridad del laboratorio de contención biológica de nivel 3 incluido en la solicitud de autorización.

2) Formación del personal adscrito:

El personal adscrito ha recibido la formación e información indicada en el Manual de Bioseguridad adjuntado en la solicitud de autorización del laboratorio de nivel 3 de contención biológica (ver apartado 5 del Manual). Todo el personal implicado tiene experiencia en la manipulación de los agentes biológicos que se indican en esta solicitud, además durante los procedimientos siempre habrá dos personas en el laboratorio.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Los programas de limpieza, desinfección y descontaminación están descritos en el Manual de Bioseguridad del laboratorio de nivel 3 de contención biológica incluido en la solicitud de autorización (ver apartados 7 y 8 del Manual)

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

Los programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento están detallados en el Manual de Bioseguridad del laboratorio de nivel 3 de contención biológica incluido en la solicitud de autorización (Ver apartado 6 del manual).

5) Programas de inspección y control del confinamiento:



nivel 3 de Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

4) Planes de emergencia:

El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio y que están indicados en el Manual de Bioseguridad del mismo.

PARTE A

DIRECCION GENERAL DE
CALIDAD Y EVALUACION
AMBIENTAL Y MEDIO NATURAL

Tipos 2, 3 y 4

COMISIÓN NACIONAL DE
BIOSEGURIDAD

ANEXO I

Información relativa al inserto

Número de dianas de Enzimas de Restricción

AanI	3	Bcgl	-	Bsp13I	-	Cfr13I	4	Hgal	3	Nli3877I	1	Sdal	-
AarI	-	BciT130I	2	Bsp1407I	-	Cfr42I	-	HgiAI	2	NmeAIII	1	SdeAI	3
AasI	1	BciVI	1	Bsp143I	13	Cfr9I	-	HgiCI	4	NmeDI	2	SdeOSI	-
AatII	1	BclI	1	Bsp1720I	-	CfrI	4	HgiJII	2	NmuCI	3	SduI	6
AbsI	1	BcnI	6	Bsp19I	1	Chal	13	Hhal	12	NotI	-	SecI	8
Acc16I	1	BcoDI	3	Bsp24I	2	Cjel	2	Hin1I	3	Nrul	-	Sell	7
Acc36I	3	BcuI	-	Bsp68I	-	CjeNIII	2	Hin1II	13	Nsbl	1	SetI	41
Acc65I	1	Bdal	-	BspACI	21	CjePI	2	Hin4I	4	Nsil	-	SexAI	-
AccB1I	4	BetI	2	BspCNI	3	Clal	1	Hin4II	3	NspBII	2	SfaAI	-
AccB7I	-	Bfal	4	BspD6I	3	Cpol	1	Hin6I	12	Nspl	-	SfaNI	8
AccBSI	2	Bfil	3	BspDI	1	Csel	3	HincII	1	NspV	-	Sfcl	3
AccI	1	Bfml	3	BspEI	-	Csil	-	HindII	1	OliI	-	Sfel	3
AccII	7	Bfol	2	BspFNI	7	Csp6I	10	HindIII	2	Pabl	10	Sfil	-
AccIII	-	Bfrl	-	BspHI	1	CspAI	-	Hinfl	5	Pacl	-	Sfol	2
AceIII	1	BfuAI	3	BspLI	7	CspCI	1	HinP1I	12	Pael	-	Sfr274I	1
Acil	21	BfuCI	13	BspLU11I	-	Cspl	1	Hpal	-	PaeR7I	1	Sfr303I	-
AcII	-	Bful	1	BspMI	3	CstMI	-	HpalI	14	Pagl	1	Sful	-
AcIWI	8	BgII	-	BspMII	-	CviAII	13	HphI	1	PalAI	-	Sgel	153
Acol	4	BgIII	1	BspOI	1	CviJI	57	Hpy166II	3	PasI	-	Sgfl	-
Acsi	4	BinI	8	BspPI	8	CviKI-1	57	Hpy178III	16	Paul	-	SgrAI	-
AcuI	3	BisI	19	BspQI	2	CviQI	10	Hpy188I	6	Pcel	-	SgrBI	-



Acvl	-	Blnl	-	BspT104I	-	CviRI	6	Hpy188III	16	Pcil	-	SgrDI	-	
AcyI	3	Blpl	-	BspT107I	4	Ddel	12	Hpy8I	3	PciSI	2	SgrTI	50	
Adel	-	BlsI	19	BspTI	-	DinI	2	Hpy99I	6	Pcsi	5	SgsI	-	
Afal	10	BmcAI	-	BsrBI	2	Dpnl	13	HpyAV	3	PctI	-	SimI	4	
Afel	-	Bme1390I	8	BsrDI	1	DpnII	13	HpyCH4III	6	Pdil	1	Slal	1	
Afil	5	Bme18I	1	BsrFI	2	Dral	1	HpyCH4IV	10	Pdml	1	Smal	-	
AfIII	-	BmeRI	-	BsrGI	-	Drall	2	HpyCH4V	6	Pfel	2	Smil	-	
AfIII	3	BmeT110I	1	Bsrl	7	Drall	-	HpyF10VI	14	Pfl23II	-	SmiMI	1	
Agel	-	BmgBI	-	BsrSI	7	DraRI	1	HpyF3I	12	PflFI	1	SmlI	2	
Agsl	4	BmgT120I	4	BssAI	2	DrdI	1	HpySE526I	10	PflMI	-	Smol	2	
AhalII	1	Bmil	7	BssECI	8	DrdIV	2	Hsp92I	3	Pfol	-	Smul	2	
Ahdl	-	BmrFI	8	BssHII	-	Dril	-	Hsp92II	13	Phol	7	SnaBI	1	
AhII	-	BmrI	3	BssKI	8	Dsal	1	HspAI	12	PinAI	-	Spel	-	
Ajil	-	BmsI	8	BssMI	13	DseDI	1	Kasl	2	PlaDI	4	SphI	-	
Ajnl	2	BmtI	1	BssNAI	-	Eael	4	KfII	-	Ple19I	-	SplI	-	
Ajul	-	Bmul	3	BssNI	3	Eagl	1	Kpn2I	-	PleI	3	Srfl	-	
AleI	-	BoxI	-	BssSI	2	Eam1104I	2	Kpnl	1	PmaCI	-	Sse232I	-	
AlfI	-	Bpil	1	BssT1I	2	Eam1105I	-	Krol	1	PmeI	-	Sse8387I	-	
Alol	-	BplI	1	Bst1107I	-	EarI	2	Ksp22I	1	PmII	-	Sse8647I	-	
AluBI	16	Bpml	-	Bst2BI	2	Ecil	1	Ksp632I	2	Ppil	-	Sse9I	10	
Alul	16	Bpu10I	-	Bst2UI	2	Ecl136II	-	KspAI	-	PpsI	3	SseBI	-	
Alw21I	2	Bpu1102I	-	Bst4CI	6	EclXI	1	Kspl	-	Ppu10I	-	Ssil	21	
Alw26I	3	Bpu14I	-	Bst6I	2	Eco105I	1	Kzo9I	13	Ppu21I	5	SspD5I	1	
Alw44I	-	BpuAI	1	BstACI	3	Eco130I	2	Lgul	2	PpuMI	-	SspDI	2	
Alwl	8	BpuEI	1	BstAFI	-	Eco147I	-	Lpnl	2	PscI	-	Sspl	1	
AlwNI	1	BpuMI	6	BstAPI	1	Eco24I	2	LpnPI	30	PshAI	-	SstE37I	-	
Ama87I	1	BpvUI	-	BstAUI	-	Eco31I	2	Lsp1109I	9	PshBI	2	SstI	-	



Aor13HI	-	Bsa29I	1	BstBAI	5	Eco32I	1	LweI	8	PsiI	3	Sth132I	14
Aor51HI	-	BsaAI	5	BstBI	-	Eco47I	1	MabI	-	Psp03I	1	Sth302II	14
AoxI	7	BsaBI	2	BstC8I	14	Eco47III	-	Mael	4	Psp124BI	-	StrI	1
ApaBI	1	BsaHI	3	BstDEI	12	Eco52I	1	Maell	10	Psp1406I	-	StsI	7
Apal	1	BsaI	2	BstDSI	1	Eco53kl	-	MaellI	4	Psp5II	-	Stul	-
ApaLI	-	BsaJI	8	BstEII	-	Eco57I	3	Mall	13	Psp6I	2	StyD4I	8
ApeKI	9	BsaWI	2	BstENI	-	Eco57MI	3	Maql	-	PspCI	-	Styl	2
Apol	4	BsaXI	-	BstF5I	7	Eco72I	-	MauBI	-	PspEI	-	Swal	-
ApyPI	2	Bsbl	1	BstFNI	7	Eco81I	-	Mbil	2	PspGI	2	Taal	6
AquII	2	Bsc4I	5	BstH2I	2	Eco88I	1	Mbol	13	PspLI	-	Tail	10
AquIII	-	BscAI	8	BstHHI	12	Eco91I	-	Mboll	5	PspN4I	7	TaqI	10
AquIV	1	Bse118I	2	BstKTI	13	EcoHI	6	McaTI	-	PspOMI	1	TaqII	2
ArsI	-	Bse1I	7	BstMAI	3	EcoICRI	-	Mcrl	1	PspOMII	2	Tasl	10
Ascl	-	Bse21I	-	BstMBI	13	EcoNI	-	Mfel	-	PspPI	4	Tatl	-
Asel	2	Bse3DI	1	BstMCI	1	EcoO109I	2	Mfil	6	PspPPI	-	Taul	10
Asi256I	13	Bse8I	2	BstMWI	14	EcoO65I	-	MhII	6	PspPRI	2	Tfil	2
AsiGI	-	BseAI	-	BstNI	2	EcoRI	2	MIsI	1	PspXI	1	Tru1I	16
AsiSI	-	BseBI	2	BstNSI	-	EcoRII	2	MluCI	10	Psrl	-	Tru9I	16
Asp700I	1	BseCI	1	BstOI	2	EcoRV	1	MluI	2	PssI	2	TscAI	4
Asp718I	1	BseDI	8	BstPAI	-	EcoT14I	2	MluNI	1	PstI	1	TseFI	3
AspA2I	-	BseGI	7	BstPI	-	EcoT22I	-	Mly113I	2	PstNI	1	Tsel	9
AspBHI	152	BseJI	2	BstSCI	8	EcoT38I	2	MlyI	3	Psul	6	Tsol	4
AspEI	-	BseLI	5	BstSFI	3	Egel	2	Mmel	-	Psyl	1	Tsp45I	3
Aspl	1	BseMI	1	BstSLI	3	Ehel	2	MnII	14	Ptel	-	Tsp4CI	6
AspLEI	12	BseMII	3	BstSNI	1	ErhI	2	Mph1103I	-	Pvul	-	TspDTI	3
AspS9I	4	BseNI	7	BstUI	7	EsaBC3I	10	Mrel	-	Pvull	2	TspEI	10
AssI	-	BsePI	-	BstV1I	9	Esp3I	-	Mrol	-	R1.BceSIV	9	TspGWI	-



AsuC2I	6	BseRI	-	BstV2I	1	Espl	-	MroNI	1	Rcal	1	TspMI	-
AsuHPI	1	BseSI	3	BstX2I	6	Fael	13	MroXI	1	Rcel	1	TspRI	4
AsuI	4	BseX3I	1	BstXI	-	Fail	26	MscI	1	RdeGBII	1	TstI	1
AsuII	-	BseXI	9	BstYI	6	Fall	1	Msel	16	RdeGBIII	2	Tth111I	1
AsuNHI	1	BseYI	2	BstZ17I	-	Faql	4	MslI	1	Rgal	-	Tth111II	3
Aval	1	Bsgl	-	BstZI	1	Fatl	13	Msp20I	1	Rigl	-	UcoMSI	-
Avall	1	Bsh1236I	7	Bsu15I	1	Faul	2	MspA1I	2	RleAI	-	Unbl	4
Avill	1	Bsh1285I	1	Bsu36I	-	FauNDI	-	MspCI	-	RpaB5I	3	Van91I	-
AvrII	-	BshFI	7	Bsul	1	Fbal	1	Mspl	14	RpaBI	-	Vha464I	-
Axyl	-	BshNI	4	BsuRI	7	FbII	1	MspJI	280	Rpal	-	Vnel	-
BaeGI	3	BshTI	-	Btgl	1	Fmul	4	MspR9I	8	Rrul	-	VpaK11AI	1
Bael	-	BshVI	1	BtgZI	3	Fnu4HI	19	Mssl	-	Rsal	10	VpaK11BI	1
Ball	1	BsiEI	1	BthCI	19	FnuDII	7	MstI	1	RsaNI	10	Vspl	2
BamHI	-	BsiHKAII	2	Btrl	-	FokI	7	MunI	-	Rsel	1	Wvil	2
BanI	4	BsiHKCI	1	BtsCI	7	FriOI	2	Mva1269I	-	Rsr2I	1	Xagl	-
BanII	2	Bsil	2	BtsI	1	FseI	-	Mval	2	RsrII	1	Xapl	4
BarI	-	BsiSI	14	BtsIMutI	4	Fsp4HI	19	Mvnl	7	Sacl	-	Xbal	2
BasI	-	BsiWI	-	BtuMI	-	FspAI	-	Mvrl	-	SaclI	-	Xcel	-
Baul	2	BsiYI	5	Bvel	3	FspBI	4	Mwol	14	Sall	1	Xcml	1
Bbel	2	BslFI	4	Cac8I	14	FspEI	262	Nael	1	SanDI	-	Xhol	1
Bbr7I	1	BsII	5	Cail	1	Fspl	1	Narl	2	Sapl	2	XholI	6
BbrPI	-	BsmAI	3	CauII	6	GdIII	1	Ncil	6	SaqAI	16	Xmal	-
BbsI	1	BsmBI	-	CchII	-	Glal	12	Ncol	1	Satl	19	XmalII	1
Bbv12I	2	BsmFI	4	CchIII	1	Glul	19	Ndel	-	Sau3AI	13	XmaII	-
BbvCI	-	BsmI	-	Ccil	1	Gsal	2	NdelI	13	Sau96I	4	Xmil	1
Bbvl	9	BsnI	7	CciNI	-	Gsul	-	NgoAVIII	-	Saul	-	Xmnl	1
BbvII	1	Bso31I	2	Cdil	6	Hael	1	NgoMIV	1	Sbfl	-	Xspl	4



BccI	5	BsoBI	1	Cdpl	-	HaeII	2	NheI	1	Scal	-	ZraI	1
Bce83I	1	Bsp119I	-	CellI	-	HaeIII	7	NlaCI	-	SchI	3	Zrml	-
BceAI	3	Bsp120I	1	CfoI	12	HaeIV	1	NlaIII	13	Scil	1	Zsp2I	-
Bcefl	3	Bsp1286I	6	Cfr10I	2	HapII	14	NlaIV	7	ScrFI	8		

Mapa de restricción del inserto

<Serial Cloner V2.5> -- <24 jul 2017 10:15>

Restriction map of Untitled Sequence #1

Showing restriction enzymes cutting maximum 1 time [using RELibrary as a Restriction Enzyme Library]

```

                                     >BsbI
                                     |
taacaggttggtgataagtccccggtctctagaccctatagtgagtcgtattacaaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattcttttgat < 100
*  Q  V  G  *  *  V  P  G  L  *  T  P  I  V  S  R  I  T  N  W  N  N  T  Q  P  Y  L  G  L  F  F  *  F
  N  R  L  A  D  K  S  P  V  S  R  P  L  *  *  V  V  L  Q  T  G  T  T  L  N  P  I  S  V  Y  S  F  D
  T  G  W  L  I  S  P  R  S  L  D  P  Y  S  E  S  Y  Y  K  L  E  Q  H  S  T  L  S  R  S  I  L  L  I
attgtccaaccgactattcaggggccagagatctggggatatcactcagcataatgtttgaccttggtgtgagttgggatagagccagataagaaaacta
      10      20      30      40      50      60      70      80      90
```

```

                                <AceIII
                                |
ttataagggattttgccgatttcggcctatttggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattttaacaaaatattaacgcttacaattt < 200
  I  R  D  F  A  D  F  G  L  L  V  K  K  *  A  D  L  T  K  I  *  R  E  F  *  Q  N  I  N  A  Y  N  L
L  *  G  I  L  P  I  S  A  Y  W  L  K  N  E  L  I  *  Q  K  F  N  A  N  F  N  K  I  L  T  L  T  I  *
  Y  K  G  F  C  R  F  R  P  I  G  *  K  M  S  *  F  N  K  N  L  T  R  I  L  T  K  Y  *  R  L  Q  F
aatattccctaaaacggctaaagccggataaccaattttttactcgactaaattgtttttaaattgcgcttaaaattgttttataattgcgaatgtttaa
      110      120      130      140      150      160      170      180      190
```

SnaBI
BstSNI
Eco105I

>TstI



aggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccagatccccacgatgcgtccggcgtagaggatctgaagatcagcagttcaacctgttgatagtacgt < 300
G G T F R G N V R G T R S P R C V R R R G S E D Q Q F N L L I V R
V A L F G E M C A E P D P H D A S G V E D L K I S S S T C * * Y V
R W H F S G K C A R N Q I P T M R P A * R I * R S A V Q P V D S T Y
tccaccgtgaaaagccccctttacacgcgccttgggtctaggggtgctacgcaggcgcacatctcctagacttctagtcgtcaagttggacaactatcatgca
210 220 230 240 250 260 270 280 290

actaagctctcatgtttcacgtactaagctctcatgttttaacgtactaagctctcatgttttaacgaactaaaccctcatggctaacgtactaagctctca < 400
T K L S C F T Y * A L M F N V L S S H V * R T K P S W L T Y * A L M
L S S H V S R T K L S C L T Y * A L M F N E L N P H G * R T K L S
* A L M F H V L S S H V * R T K L S C L T N * T L M A N V L S S H
tgattcgagagtacaaagtgcattgattcgagagtacaaattgcattgattcgagagtacaaattgcttgatttgggagtagcattgcattgattcgagagt
310 320 330 340 350 360 370 380 390

tggctaacgtactaagctctcatgtttcacgtactaagctctcatgtttgaacaataaaattaatataaatcagcaacttaaatagcctctaagggtttta < 500
A N V L S S H V S R T K L S C L N N K I N I N Q Q L K * P L R F *
W L T Y * A L M F H V L S S H V * T I K L I * I S N L N S L * G F K
G * R T K L S C F T Y * A L M F E Q * N * Y K S A T * I A S K V L
accgattgcattgattcgagagtacaaagtgcattgattcgagagtacaaacttgcttatttttaattatatttagtcgttgaatttatcgagattccaaat
410 420 430 440 450 460 470 480 490

AhaIII

DraI

agttttataagaaaaaaagaatatataaggcttttaagcttttaaggttttaacgggttggtggacaacaagccagggatgtaacgcactgagaagccctt < 600
V L * E K K E Y I R L L K L L R F N G C G Q Q A R D V T H * E A L
F Y K K K K N I * G F * S F * G L T V V D N K P G M * R T E K P L
S F I R K K R I Y K A F K A F K V * R L W T T S Q G C N A L R S P *
tcaaaatattcttttttttcttatatattccgaaaatttcgaaaattccaaattgccaacacctgttggttcggtccctacattgcgtgactcttcgggaa
510 520 530 540 550 560 570 580 590

>BbvII



>BpuAI
>BpiI
>Bbr7I
>BstV2I
>BbsI

agagcctctcaaagcaattttcagtgacacaggaacacttaacggctgacagaattcttgaagacgaaagggcctcgtgatacgcctatttttataggtt < 700
R A S Q S N F Q * H R N T * R L T E F L K T K G P R D T P I F I G *
E P L K A I F S D T G T L N G * Q N S * R R K G L V I R L F L * V
S L S K Q F S V T Q E H L T A D R I L E D E R A S * Y A Y F Y R L
tctcggagagtttcgttaaaagtcactgtgtccttgtgaattgccgactgtcttaagaacttctgctttcccgagcactatgcggataaaaaatatccaa
610 620 630 640 650 660 670 680 690

StrI
Ama87I
BmeT110I
Sfr274I
XhoI
BsiHKCI
SlaI
Eco88I
SciI
AbsI
PspXI

RcaI
BspHI
CciI
PagI

ZraI
AatII

PstI

Eco32I
EcoRV

Bsu15I FblI Pae7I
BseCI SalI Nli3877I
BshVI AccI BsoBI
ClaI XmiI AvaI
BspDI HincII
Bsa29I HindII

aatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcgggggttataagggctgcaggaattcgatatcaagcttatcgataaccgtcgacct < 800
C H D N N G F L D V R W H F S G L * G L Q E F D I K L I D T V D L
N V M I I M V S * T S G G T F R G Y K G C R N S I S S L S I P S T S
M S * * * W F L R R Q V A L F G V I R A A G I R Y Q A Y R Y R R P
ttacagtactattattaccaaagaatctgcagtcaccgtgaaaagccccaatattcccgcagtccttaagctatatagttcgaatagctatggcagctgga
710 720 730 740 750 760 770 780 790



Acc65I
KpnI
MroXI
BmtI
Bsp120I
Asp700I
BspOI
PspOMI
XmnI
AsuNHI
ApaI
Asp718I
PdmI
NheI
>DraRI
BstAPI
ApaBI

cgagggggggcccggtaccgaggacgcgctcgaattaattccgctagcttcacgctgccgcaagcactcagggcgcaagggctgctaaaggaagcggaaca < 900
E G G P G T E D A S N * F R * L H A A A S T Q G A R A A K G S G T
R G G P V P R T R R I N S A S F T L P Q A L R A Q G L L K E A E H
R G G A R Y R G R V E L I P L A S R C R K H S G R K G C * R K R N T
gctcccccccgggccatggctcctgcgacgcttaattaaggcgatcgaagtgcgacggcggttcgtgagtcgccggttcccgacgatttccttcgccttgt
810 820 830 840 850 860 870 880 890

PstNI
CaiI
AlwNI

cgtagaaagccagtcgcgcagaaacgggtgctgaccccgatgaatgtcagctactgggctatctggacaagggaaaacgcaagcgcaaagagaaagcaggt < 1000
R R K P V R R N G A D P G * M S A T G L S G Q G K T Q A Q R E S R *
V E S Q S A E T V L T P D E C Q L L G Y L D K G K R K R K E K A G
* K A S P Q K R C * P R M N V S Y W A I W T R E N A S A K R K Q V
gcatactttcggtcaggcgctctttgccacgactggggcctacttacagtcgatgacccgatagacctgttcccttttgcgttcgcgtttctctttcgtcca
910 920 930 940 950 960 970 980 990

>BtsI

agcttgccagtgggccttacatggcgatagctagactgggcgggttttatggacagcaagcgaaaccggaattgccagctggggcgccctctggtaagggttggg < 1100
L A V G L H G D S * T G R F Y G Q Q A N R N C Q L G R P L V R L G
S L Q W A Y M A I A R L G G F M D S K R T G I A S W G A L W * G W E
A C S G L T W R * L D W A V L W T A S E P E L P A G A P S G K V G
tcgaacgtcaccggaatgtaccgctatcgatctgacccgcaaaaatacctgtcgttcgcttggccttaacgggtcgaccccggggagaccattccaacc
1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090

BclI
FbaI
Ksp22I



XcmI
BglII
< 1200

aagccctgcaaagtaaactggatggcttttcttgccgccaaggatctgatggcgcaggggatcaagatctgatcaagagacaggatgaggatcgtttcgca
S P A K * T G W L S C R Q G S D G A G D Q D L I K R Q D E D R F A
A L Q S K L D G F L A A K D L M A Q G I K I * S R D R M R I V S H
K P C K V N W M A F L P R I * W R R G S R S D Q E T G * G S F R M
ttcgggacgtttcatttgacctaccgaagaacggcggttctctagactaccgcgtcccttagtctctagactagttctctgtcctactcctagcaaaagcgt
1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190

EclXI
BseX3I
Bsh1285I
McrI
>GdiII
BstMCI
XmaIII
Eco52I
BsiEI
EagI <CchIII
BstZI

tgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttggggtggagaggctatttcggtatgactgggcacaaacagacaatcgggtgctctgatgc < 1300
 * L N K M D C T Q V L R P L G W R G Y S A M T G H N R Q S A A L M P
 D * T R W I A R R F S G R L G G E A I R L * L G T T D N R L L * C
 I E Q D G L H A G S P A A W V E R L F G Y D W A Q Q T I G C S D A
 actaacttggttctacctaacgtgcgtccaagaggccgcgaacccacctctccgataagccgatactgaccggtgttgctgttagccgacgagactacg
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290

DseDI
DrdI
AasI

gcgcgtgttccggctgtcagcgcagggcgcccggttctttttgtcaagaccgacctgtccggtgccctgaatgaactccaagacgaggcagcgcggtta < 1400
P C S G C Q R R G A R F F L S R P T C P V P * M N S K T R Q R G Y
R R V P A V S A G A P G S F C Q D R P V R C P E * T P R R G S A A I
A V F R L S A Q G R P V L F V K T D L S G A L N E L Q D E A A R L
gcggcacaaggccgacagtcgcgtccccgcgggccaagaaaaacagttctggctggacaggccacgggacttacttgaggttctgctccgtcgcgccgat



34 Ministerio de Agricultura,
Alimentación y Medio
Ambiente



gcccgaactgttcgccaggctcaaggcgcggtatgcccgaacggcgaggatctcgtcgtgacccatggcgatgcctgcttgccgaatatcatgggtggaaaatg < 1800
P N C S P G S R R G C P T A R I S S * P M A M P A C R I S W K M
R T V R Q A Q G A D A R R R G S R R D P W R C L L A E Y H G G K W
A E L F A R L K A R M P D G E D L V V T H G D A C L P N I M V E N G
cggccttgacaagcggtccgagttccgcgcctacgggctgccgctcctagagcagcactgggtaccgctacggacgaacggccttatagtagtaccaccttttac
1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790

gcccgttttctggattcatcgactgtggccggctgggtgtggcggaacgctatcaggacatagcgttggtaccgctgatattgctgaagagcttggcgg < 1900
A A F L D S S T V A G W V W R T A I R T * R W L P V I L L K S L A A
P L F W I H R L W P A G C G G P L S G H S V G Y P * Y C * R A W R
R F S G F I D C G R L G V A D R Y Q D I A L A T R D I A E E L G G
cggcgaaaagacctaagtagctgacaccggccgacccacaccgcctggcgatagtcctgtatcgcaaccgatgggcactataacgacttctcgaaccgcc
1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890

<AquIV

>BplI



cgaatgggctgaccgcttcctcgtgctttacggtatcgccgctcccgattcgagcgcatcgcccttctatcgcccttcttgacgagttcttctgagcgggga < 2000
N G L T A S S C F T V S P L P I R S A S P S I A F L T S S S E R D
R M G * P L P R A L R Y R R S R F A A H R L L S P S * R V L L S G T
E W A D R F L V L Y G I A A P D S Q R I A F Y R L L D E F F * A G
gcttaccgactggcgaaggagcacgaaatgccatagcggcgagggctaagcgtcgcgtagcggaagatagcggaagaactgctcaagaagactcgccct
1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990

ctctggggtaacgcgtaatacgactcactatagggctctagagaccggggacttatcagccaacctgtta < 2068
S G V R V I R L T I G S R D R G L I S Q P V X
L G Y A * Y D S L * G L E T G D L S A N L L
L W G T R N T T H Y R V * R P G T Y Q P T C X
gagaccccatgcgcattatgctgagtgatatcccagatctctggcccctgaatagtcggttgacaat
2010 2020 2030 2040 2050 2060



**NOTIFICACIÓN DE PRIMER USO DE INSTALACIONES PARA REALIZAR ACTIVIDADES DE
UTILIZACIÓN CONFINADA CON ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

Nº de Registro:	Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA INSTALACIÓN

1) Entidad

Nombre: FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Dirección postal: C/ Arzobispo Morcillo nº 4. Decanato. 28 029 (Madrid)

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: NIF: Q2818013A
Cargo: Delegado del decano para Seguridad en la Facultad de Medicina Tel: 91 497 5303
Fax:
Correo electrónico: secretario.medicina@uam.es

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: [REDACTED] [REDACTED]
Cargo: Profesora Titular de la Universidad
[REDACTED]
Correo electrónico: mariaj.garcia@uam.es

4) Responsable de bioseguridad de la instalación

Nombre y apellidos: NIF: Q2818013A
Cargo: Presidente del Comité de Ética de la Investigación UAM
Tel:
Fax:
Correo electrónico: comite.eticainvestigacion@uam.es

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

[REDACTED]

6) Existencia de comités de bioseguridad y/o Comité de Seguridad y Salud:

No se considera obligatorio, pero sí recomendable, la creación de un comité de seguridad biológica. En este sentido, la Comisión Nacional de Bioseguridad ha elaborado unas directrices para la creación de un Comité de Bioseguridad en los centros que trabajan con OMG (ver Anexo 4 de la Guía). Por otro lado, se recuerda que debe constituirse un Comité de Seguridad y Salud en todas las empresas o centros de trabajo que cuenten con 50 o más trabajadores, según el artículo 38 de la Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de riesgos laborales.

SI x NO ☐

En caso afirmativo, especificar funciones del Comité:

Artículo primero. Misión y Funciones del Comité

1.1. El Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (en lo sucesivo, CEI-UAM o el Comité) tiene como misión promover un comportamiento ético en la investigación con el control del cumplimiento de las normas deontológicas para sus diferentes actividades, al objeto de evitar conductas inadecuadas y facilitar su corrección con diligencia, así como la evaluación de los aspectos éticos de la investigación realizada tanto con fines científicos como docentes, en especial la que implica a seres humanos o la utilización de muestras de origen humano, la obtención y el tratamiento de datos de carácter personal que puedan afectar a los derechos fundamentales, la experimentación animal y la utilización de agentes biológicos u organismos modificados genéticamente, de conformidad con lo establecido en la legislación vigente.

Corresponden al Comité dentro de su ámbito de competencia, las siguientes funciones:

- a) Emitir los informes solicitados por instituciones e investigadores sobre proyectos o trabajos de investigación que impliquen estudios en seres humanos, utilización de sus datos personales o de muestras biológicas de origen humano, experimentación animal o empleo de agentes biológicos u organismos genéticamente modificados.
- b) Valorar cualquier otro proyecto de investigación que pueda afectar de modo directo a los derechos fundamentales de las personas, al bienestar de los animales y a los intereses vinculados a la defensa y protección del medio ambiente.
- c) Velar por el cumplimiento de las buenas prácticas de investigación y experimentación, en relación con los derechos e intereses a los que se refiere el apartado anterior.
- c) Elaborar informes para los órganos de gobierno de la Universidad sobre los problemas éticos relacionados con los apartados anteriores que puedan suscitar la investigación y la docencia.
- e) Promover el debate en la comunidad universitaria sobre cuestiones bioéticas de interés general.
- f) Difundir en la opinión pública las implicaciones éticas de los avances científicos y sus aplicaciones y ofrecer la información precisa para comprender su alcance y sus posibles consecuencias.
- g) Cualesquiera otras funciones que le atribuya la legislación vigente.



7) Debe señalarse si se obtiene financiación del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación para el desarrollo de las actividades propuestas. Esta información es necesaria para determinar si la instalación 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 ☐

II. DATOS GENERALES DE LA INSTALACIÓN

Deberá acompañarse un plano de situación, a escala 1:50.000 o similar, de forma que se identifique fácilmente su localización (urbana, suburbana o extraurbana).

1) Dirección de la Instalación:

2) Localización: a) urbana x
 b) suburbana ☐
 c) extraurbana i) agrícola ☐
 ii) industrial ☐

3) Descripción:

a) Edificio aislado	☐	Nº de Secciones	☐
b) Parte de un edificio	x	Nº de Secciones	1
c) Conjunto de edificios	☐	Nº de Secciones	☐

4) Especificar el número de habitaciones de las que consta cada sección, indicando la utilización de cada una de ellas.

El laboratorio de nivel de contención 3 se encuentra en la planta baja del edificio de la Facultad de Medicina, en el Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología, dentro del laboratorio D12. Ver plano adjunto.

III. DESCRIPCIÓN DE CADA UNA DE LAS SECCIONES DE LA INSTALACIÓN

Cumplimentar una hoja por cada una de las secciones o departamentos interesados en la notificación y las adicionales que fueran necesarias.

1) Finalidad de la sección o departamento:

- | | |
|------------------------------------|--------------------------|
| a) Laboratorio de investigación | x |
| b) Planta piloto o experimental | ☐ |
| c) Planta industrial | ☐ |
| d) Tratamiento después del proceso | ☐ |
| e) Otro, especificar | |

2) La sección o secciones forman parte de uno o más departamentos a efectos administrativos:

SI ☐ NO x

En caso afirmativo, indicar a qué departamentos pertenecen y la finalidad de los mismos:

3) Nombre y formación del responsable de la sección:

Director del Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología.
Fernando Rodríguez Artalejo. Catedrático de Universidad.

4) Descripción de las dependencias dentro de cada sección: laboratorios, cuartos de técnicas o equipos, oficinas, etc.

Se adjuntará plano de dichas dependencias: sección (es) o conjunto del edificio, a escala y con el detalle suficiente que permita apreciar las circunstancias relevantes en cada caso para la evaluación de riesgos.

DEPENDENCIAS

El laboratorio de NIVEL DE CONTENCION 3 (P3) ha sido notificado al IRSST en noviembre de 2010 con referencia 18/216905.9/10. El laboratorio P3 cumple las especificaciones del RD 664/1997.

El laboratorio cuenta con una superficie útil aproximada de 35 m², organizadas según la disposición que aparece en el plano:

- Vestuario limpio (4,5 m²)
- Exclusa de entrada (3 m²)
- Vestuario sucio (2 m²)
- Laboratorio de trabajo (16 m²)
- Zona técnica (4 m²).
- Área de esterilización (5,4 m²)

Teniendo en cuenta el riesgo biológico potencial, el laboratorio se divide en:

Área convencional: Vestuario limpio
Exclusa de acceso



Área biológicamente activa: Vestuario sucio
Laboratorio de trabajo.
Área de esterilización
Zona técnica

En el límite entre ambas zonas se encuentran: la puerta que separa la exclusiva de acceso del laboratorio de trabajo; la puerta que separa el vestuario sucio del vestuario limpio.

Además, existen los siguientes dispositivos de seguridad que permiten la comunicación segura entre ambas zonas y con el exterior:

- SAS biológico para paso de pequeño material (entre el área de esterilización y la antesala).
- El laboratorio cuenta con ordenador conectado a la red, para poder recibir y transferir datos y documentos.

IV. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD

1) Objetivo de la actividad:

Para actividades tipo 2, 3 y 4, en la que ya se haya presentado un Formulario Tipo A, es suficiente un listado de las actividades que se van a realizar.

Dentro de los ámbitos de la investigación en el campo de la Biología Molecular, el laboratorio objeto de esta solicitud está diseñado para el cultivo y amplificación a pequeña escala de *Mycobacterium tuberculosis* (agentes biológicos de nivel 3 (RD 664/1997)).

2) Clasificación de la actividad

Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y 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 del riesgo.

Tipo 1	☐
Tipo 2	☐
Tipo 3	x
Tipo 4	☐

3) Descripción de las operaciones:

3.1. Microorganismos:

a) escala experimental	x	Volumen máximo: 50 ml / ensayo
b) escala prueba piloto	☐	Volumen máximo:
c) escala industrial	☐	Volumen máximo:

3.2. Número de Plantas:

3.3. Número de Animales:

4) Periodo estimado de duración de la actividad

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).

Mínimo, duración de los proyectos de investigación (3 años).

5) Tipo de proceso biológico, para el caso de microorganismos modificados genéticamente:

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------|
| a) Cultivo continuo en fermentador | ☐ |
| b) Cultivo discontinuo en fermentador | ☐ |
| c) Otros | X |

6) 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:

OMG *recA* de *M. tuberculosis* y OMG *whiB3* de *M. tuberculosis*. Los OMGs se adquieren comercialmente, para más información, visitar la página TARGET <http://webhost.nts.jhu.edu/target/Default.aspx>

7) 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 aplicable¹ (tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

Los OMG objeto de esta autorización van a ser utilizados exclusivamente dentro de las instalaciones de nivel 3 de contención biológica y no van a ser transportados fuera

¹ 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.

V. MEDIDAS DE CONFINAMIENTO Y OTRAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN APLICADAS

El objetivo de este apartado es la descripción completa de las condiciones de la instalación, con objeto de que la Comisión Nacional de Bioseguridad pueda evaluar si se garantiza el grado de confinamiento exigido por la legislación (ver anexo 3 de la Guía, que recoge el anexo II del Real Decreto 178/2004).

Si procede, se cumplimentará una hoja por cada una de las distintas secciones o departamentos interesados en la notificación. En ningún caso se aceptará que en un mismo formulario Parte B se incluyan distintos niveles de confinamiento.

I.- LABORATORIOS		
	SÍ	NO
El laboratorio se encuentra separado de otras zonas del mismo edificio	x	
El laboratorio se encuentra en un edificio independiente		x
El laboratorio es hermético, permitiendo que se fumigue	x	
Existencia de una entrada y salida independientes	x	
Mobiliario y equipos	SÍ	NO
Superficies resistentes a agentes de descontaminación y de fácil limpieza	x	
Acceso al laboratorio a través de una esclusa	x	
Presión negativa respecto a la presión del medio ambiente inmediato	x	
Aire de entrada y de salida del laboratorio tratado con filtros HEPA	x	
Indicar el tipo de filtro HEPA:	Filtros terminales H14 en cada una de las salas. Segundo sistema de filtración bag in bag out (sala técnica) con filtros H13	
Cabina de seguridad biológica	x	
Indicar el tipo y localización de la/s cabinas de seguridad biológica:	2 cabinas de flujo laminar clase IIA de marca Tdl	
Autoclave	x	
Indicar la localización del autoclave (dentro del edificio; dentro del laboratorio, en otra dependencia de la instalación)	Autoclave dentro de la sala de esterilización.	
Normas de trabajo	SÍ	NO
Acceso restringido	x	
¿Cómo se restringe el acceso? (ej. entrada mediante tarjeta del personal autorizado)	Código de entrada al laboratorio	
Señalización de peligro biológico en la puerta	x	

Señalización de peligro biológico en el equipamiento que aloja material biológico	x	
Medidas específicas para evitar la formación y difusión de aerosoles	x	
Indumentaria de protección	x	
Indicar qué indumentaria de protección y EPIs se utilizan	Bata de un solo uso, calzas y gorro de un solo uso, guantes y mascarilla FFP3 (para hacer frente a accidentes e incidentes)	
Lavado de la ropa de trabajo		x
Indicar quien es responsable del lavado de la ropa de trabajo (empresa gestora; en la propia instalación)	La ropa de trabajo es de un solo uso. Se retira como residuo biopeligroso.	
Espacio específico para la ropa de trabajo (percheros; taquillas)	x	
Cambio de ropa y calzado antes de entrar y salir de la instalación	x	
El personal está obligado a ducharse antes de abandonar la zona controlada		x
Control eficaz de roedores e insectos	x	
Residuos	SÍ	NO
Inactivación de los OMG en el material contaminado y en los residuos	x	
Inactivación de los OMG en los efluentes de los lavabos, desagües, duchas o efluentes similares	x Biowaste	
Otras medidas	SÍ	NO
Material para la recogida de posibles vertidos (vermiculita; papel absorbente) disponible en la zona de trabajo	x	
Almacenamiento de material fungible y reactivos en el propio laboratorio	x	
Ventana de observación o similar para ver a los ocupantes	x	

II.- INVERNADEROS Y SEMILLEROS		
	SÍ	NO
Invernaderos: estructura permanente		
La pendiente permite evitar la entrada de la escorrentía de aguas superficiales		
Puertas de cierre automático.		
Equipo	SÍ	NO
Entrada a través de una esclusa con dos puertas con cerradura dependiente		

Control y gestión de aguas contaminadas		
Normas de trabajo	SÍ	NO
Medidas para controlar las especies no deseadas (insectos y otros artrópodos, roedores, etc.)		
Procedimientos para evitar la diseminación de OMG durante el transporte de material vivo entre el invernadero o semillero, la estructura protectora y el laboratorio		

III.- UNIDADES DE ANIMALES		
	SÍ	NO
Aislamiento en la unidad de animales (1)		
Locales de animales (2) separados mediante puertas bloqueables		
Locales de animales diseñados para la descontaminación: material impermeable y fácil de lavar		
Suelo y paredes fáciles de lavar		
Confinamiento de los animales en receptáculos adecuados como jaulas, corrales o cajas		
Filtros en las cajas de aislamiento o habitaciones aisladas		
Indíquese los métodos de control de posibles escapes que se emplean:		

(1) Unidad de animales: edificios o zonas separadas de un edificio que disponga de locales y otras zonas como vestuarios, duchas, autoclaves, almacén de alimentos, etc.

(2) Locales de animales: locales que habitualmente se empleen para alojar animales de reserva, cría o experimentación o para realizar pequeñas intervenciones quirúrgicas.

IV.- OTRAS ACTIVIDADES		
	SÍ	NO
Los organismos viables deben mantenerse en un sistema que separe el proceso del entorno (sistema cerrado)		
Control de los gases de escape del sistema cerrado		
Control de aerosoles durante la toma de muestras, la introducción de material en un sistema cerrado o la transferencia de material a otro sistema cerrado		
Inactivación del líquido de cultivo en masa antes de extraerlo del sistema cerrado		
Sistemas de cierre diseñados para minimizar o evitar la liberación		
Zona controlada con capacidad para contener el vertido de todo el contenido del sistema cerrado		
Zona controlada hermética para fumigación		
Equipo	SI	NO

Entrada a través de esclusa		
Superficies resistentes a ácidos, álcalis, disolventes, desinfectantes y agentes de descontaminación, y de fácil limpieza		
Medidas específicas para ventilar adecuadamente la zona controlada y de este modo minimizar la contaminación atmosférica		
Zona controlada con presión negativa respecto a la presión circundante		
Tratamiento del aire de salida y entrada de la zona filtrado con filtros HEPA		
Normas de trabajo	SÍ	NO
Sistemas cerrados situados en una zona controlada		
Acceso restringido exclusivamente al personal autorizado		
Obligación de indicar el peligro biológico		
El personal deberá ducharse antes de abandonar la zona controlada		
Indumentaria de protección para el personal		
Residuos	SÍ	NO
Inactivación de los OMG en los efluentes de lavabos y duchas o efluentes similares		
Inactivación de los OMG en el material contaminado y los residuos, incluidos los OMG presentes en el efluente de trabajo antes del vertido final		

1) Adjuntar documentación relativa a protocolos de uso, validación y revisión periódica de equipos e instalaciones.

Las cabinas de seguridad biológica son revisadas anualmente por una empresa especializada.
Ver documentos Anexo

2) Indicar que otras normas internas (PNT) se aplican, tanto a la instalación como a la actividad o actividades que se desarrollan (exposición a agentes biológicos, experimentación con animales, gestión y eliminación de residuos, etc.)

Se adjunta Manual de Bioseguridad de la instalación

VI. **PLANES DE EMERGENCIA**

Se deberá cumplimentar para todos los casos excepto para operaciones de utilización confinada de Tipo 1.

- 1) Información sobre prevención de accidentes y planes de actuación en situaciones de emergencia.

Ver Manual de Bioseguridad del laboratorio. Páginas 35-39

- 2) Para instalaciones en las que se vayan a llevar a cabo operaciones de utilización confinada de tipo 3 y 4, deberá adjuntarse además la siguiente información:

- a) Riesgos específicos y potenciales debidos al emplazamiento.

El laboratorio P3 se encuentra en la Facultad de Medicina de la UAM. Al tratarse de un centro docente, por lo que un riesgo importante es el de controlar el acceso a las instalaciones P3. Este control de acceso se realiza mediante código secreto y llave en la puerta de entrada al recinto (entrada desde la antesala). A partir de este punto todas las puertas del laboratorio tienen un sistema de enclavamiento secuencial, de manera que en todo momento se impide el contacto aéreo directo entre la zona biológicamente activa y la zona convencional y de esta con el exterior.

- b) Medidas preventivas aplicadas, tales como equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento.

La climatización del laboratorio se realizará por una unidad de tratamiento de aire única para frío y calor.

El sistema de climatización se ha instalado en las conducciones de aire tratado justo antes de la filtración, con una potencia frigorífica de 7000 frigorías y su equivalente en bomba de calor. El desagüe del sistema de climatización interno va al depósito de tratamiento de efluentes contaminados, con una máquina motocondensadora a ubicar en el exterior adyacente al laboratorio (patio inglés).

La distribución de agua fría a la unidad climatizadora se realizará mediante un único grupo hidráulico de bombeo. Se instalará un depósito de inercia que evite los arranques y paradas continuas de los compresores.

En todos los circuitos hay instalados elementos precisos para el correcto funcionamiento y mantenimiento de la instalación, como termómetros, manómetros e interruptores de flujo.

Hay instalados purgadores de aire en los puntos altos de la instalación y llaves de vaciado en los puntos bajos.

Extracción del aire

Existen filtros terminales H14 en cada una de las salas, siendo su tamaño proporcional al tamaño de la sala. Esto evita la salida de la contaminación de las conducciones. Antes de la caja de extracción se ha colocado un segundo sistema de filtración bag in bag out (en la sala técnica) con filtros H13 para facilitar una segunda filtración de aire y permitir el cambio de los filtros interiores sin perder las condiciones de esterilidad a la salida. En las conducciones de extracción hay instalados sistemas de válvulas controladas electrónicamente que permiten aislar cada una de las salas en el momento de la esterilización.

El aire estéril extraído es eliminado en su totalidad al exterior.

Existe un extractor de reserva que se pondrá en marcha cuando la pérdida de carga debida a los filtros instalados en extracción supere un valor umbral preestablecido. Al mismo tiempo, se encenderá un piloto de alarma de mal funcionamiento en el cajón de filtración.

Impulsión de aire

El aire de impulsión se toma del exterior haciéndolo pasar por la unidad de climatización interna, siendo conducido hasta las salas y filtrado mediante filtros terminales H 13 en cada una de las salas. Previamente el aire es prefiltrado mediante prefiltros G4 y G8.

Este sistema mantiene las presiones negativas indicadas en la tabla expresada más adelante.

En el conducto general de impulsión se ha instalado un filtro absoluto con clasificación H-13 para conseguir condiciones de sala limpia dentro del laboratorio P3.

Las conducciones de impulsión y retorno, estarán contruidos en chapa de acero galvanizado. Estas conducciones estarán provistas de puertas de inspección herméticas.

Los motores de impulsión y extracción están enclavados electrónicamente de modo que, ante cualquier problema en el motor de extracción, el de impulsión se pare.

El sistema contará con procedimientos de detección de anomalías en la depresión y su indicación mediante alarmas visuales y sonoras tanto dentro como fuera del laboratorio de bioseguridad.

Gradiente de presiones negativas

Para evitar posibles escapes de aire contaminado, así como contaminaciones cruzadas entre las diferentes estancias se establece un gradiente negativo de presiones diferenciadas adecuado. La presión más baja se da en la sala técnica, seguida del laboratorio de trabajo y sala de esterilización (salas con la misma presión), siendo menor que en la esclusa de entrada y en el vestuario sucio (salas con la misma presión) y finalmente es positiva en el vestuario limpio.

Los valores indicados a continuación son relativos al exterior:

- Vestuario limpio +15Pa.
- Exclusa de entrada y vestuario sucio -15Pa
- Laboratorio de trabajo y sala de esterilización -25Pa.
- Sala técnica -35Pa.

El control de dicho gradiente se realiza mediante manómetros diferenciales existentes en las dependencias del laboratorio y los existentes en el cajón de filtración.

Hay instalados indicadores de presión de las diferentes salas en el exterior, así como pilotos de alarma (óptico/acústica) que advierten de una posible igualación de presiones con el exterior.

EFLUENTES LÍQUIDOS

Dentro del laboratorio P3 no existe conexión con la red de alcantarillado (pilas, grifos, etc.) con excepción de la posible conexión de salida del Biowaste explicada más adelante.

Los residuos líquidos provenientes de las actividades de investigación, medios de cultivo, sobrenadantes, etc. serán tratados conforme al DECRETO 83/1999, de 3 de junio, por el que se regulan las actividades de producción y de gestión de los residuos biosanitarios y citotóxicos en la Comunidad

de Madrid. El procedimiento que está detallado en el manual de bioseguridad del laboratorio incluye autoclavado seguido de esterilización externa en el SAS de muestras.

En el interior del laboratorio de trabajo (ver plano), hay un lavabo con una fuente lavajos accionada por pie a utilizar únicamente en casos de emergencia. Desde aquí se ha instalado una conducción de desagüe a un tanque de 100 litros de almacenamiento y tratamiento químico de líquidos antes de su vertido a la red de efluentes generales (sistema biowaste).

Este sistema es una unidad autónoma con los siguientes componentes:

- Tanque de almacenamiento y tratamiento de 100 litros.
- Unidades de dosificación de agentes químicos.
- Bombas de trasiego
- Cuadro de control local

El tanque está ubicado en un bastidor autoportante y se debe posibilitar el vaciado periódico del mismo.

INSTRUMENTOS PARA INACTIVACIÓN BIOLÓGICA Y ESTERILIZACIÓN

A- Autoclave

Situado en la sala de esterilización, es de la marca Matachana, modelo 80LR-1-SM con capacidad de 83 litros, con interior cilíndrico y dimensiones de la cámara 40cm diámetro x 66,5 cm de profundo. Posee dispositivo de seguridad de apertura de puerta y generador de vapor propio.

B- SAS Biológico de muestras

Existe un SAS biológico (TDI, modelo SAS404050V) para el paso de materiales, que permita una neutralización biológica en superficie de elementos biocontaminados.

Este equipo tiene unas dimensiones exteriores de 780x550x550 mm y unas dimensiones interiores de 450x500x500 mm.

Es SAS es un mueble de forma prismática con acabado final en acero inoxidable pulido, con puertas de acceso enclavadas al interior del mismo. Tiene un diseño estanco entre salas y entre cada sala y la cámara interna.

El aparato posee dos puertas con ventana con junta perimetral y un sistema de enclavamientos electromagnéticos, que impidan la apertura de una puerta cuando la otra se encuentre abierta, manteniendo asimismo las puertas cerradas durante los ciclos de ventilación. Además, tienen dos paneles de mando idénticos en ambos lados del SAS.

El SAS está dotado de un doble sistema de purificación: flujo horizontal transversal de aire estéril e irradiación ultravioleta. Ambos sistemas pueden ser usados de forma conjunta.

Los paneles de mando constan de los siguientes elementos:

- Pulsador de apertura de puertas
- Testigo indicador de puertas
- Interruptor/cronómetro de la ventilación estéril
- Interruptor/cronómetro de radiación ultravioleta

Los tiempos de trabajo serán ajustables mediante un teclado programable. Para la esterilización total de las micobacterias, se utilizan tiempos más prolongados que para otras bacterias, siendo de 40-50 minutos.

El equipo tiene un sistema de tratamiento de aire que permita la descontaminación del mismo antes de que salga al exterior. Disponiendo de un ventilador de impulsión y otro de extracción. El aire impulsado al interior del SAS es previamente filtrado por un prefiltro para ser posteriormente filtrado por un filtro HEPA antes de su entrada en la cámara.

El aire del interior del SAS se extrae por la parte inferior y es conducido a través de un filtro HEPA con el fin de que esté descontaminado antes de llegar al ventilador de extracción.

SISTEMAS DE DETECCIÓN Y EXTINCIÓN DE INCEDIOS. ALARMA Y EVACUACIÓN.

Extinción de incendios

Existen dos extintores portátiles de CO₂ con una carga de 5 Kg. Estos extintores se han colocado en soportes señalizados en la sala del laboratorio.

Alarma y detección.

El laboratorio cuenta con detectores de incendio en la sala técnica y en el laboratorio, y un pulsador de emergencia colocado cerca de la puerta de salida a la antesala desde el vestuario limpio. Estos elementos van conectados a la central de alarma Notifier ID 3000 del edificio de Decanato (sala de Vigilancia).

Alumbrado de emergencia y evacuación.

Se ha instalado alumbrado de emergencia que garantiza una iluminación de 1 lux como mínimo, en el nivel del suelo de los recorridos de evacuación.

Está formado por equipos incandescentes autónomos (1 h) de señalización y emergencia.

c) Procedimientos y planes de comprobación de la eficacia permanente de las medidas de confinamiento.

El sistema cuenta con una alarma visual y sonora que avisa de anomalías en el sistema de depresión.

c) Descripción de la información suministrada a los trabajadores.

Los requisitos para ser autorizado como usuario del laboratorio P-3 son:

- Solicitar la autorización a la Comisión de Bioseguridad del laboratorio P3 con el informe del jefe de línea/laboratorio. Remitir un informe de la experimentación a realizar al Jefe del laboratorio P3. Se dará la autorización después de asegurar que conoce todos los procedimientos y que se ha estado 20 horas de entrenamiento bajo la enseñanza y responsabilidad de otro "usuario autorizado".
- Someterse a los reconocimientos médicos previos y periódicos que dicte la legislación. Sólo podrán obtener autorización aquellos usuarios que den Apto en el reconocimiento médico realizado por el Servicio de Salud Laboral de la Universidad.
- Leer el manual de bioseguridad P3.
- Realizar una entrevista con el Jefe del laboratorio P3 donde se dará una explicación específica de todos los procedimientos del laboratorio.

- Rellenar el impreso específico de solicitud de autorización para utilización del P3.
- Seguir durante 20 horas el entrenamiento específico, cuyo responsable es otro usuario autorizado del P3 (o el propio jefe del laboratorio). Durante esta fase del entrenamiento inicial, el usuario debe estar acompañado por otro usuario autorizado en todos los procedimientos que se realicen. En dicho entrenamiento, el usuario obtendrá información y aprenderá todos los procedimientos que se deben llevar a cabo, el riesgo potencial de los agentes biológicos utilizados y los planes de emergencia a seguir en caso de accidente o incidente.

Después de estos requisitos se le autorizará como “Usuario P3”, debiendo asegurar que:

- Asumirá la responsabilidad de seguir todos los procedimientos y las normas establecidas.
- Comunicará al Jefe del Laboratorio P3 cualquier problema relacionado con los procedimientos o equipos que puedan dar lugar a riesgos biológicos.
- Utilizará exclusivamente los agentes biológicos previamente autorizados por la Comisión de Bioseguridad P3 y los protocolos aprobados.
- Comunicará cualquier incidente o exposición a agentes biológicos, al Jefe del laboratorio P3, a la Comisión de Bioseguridad y al Servicio de Prevención.
- Acudirá a los seminarios específicos sobre bioseguridad y participará en el entrenamiento y formación de nuevos usuarios.
- Comunicará cualquier infracción o problema observado en la utilización del laboratorio P3, así como cualquier sugerencia para mejorar la seguridad en la utilización de dicho laboratorio.
- La Comisión de Bioseguridad P3 y/o el Jefe del Laboratorio P3 podrá desautorizar la utilización del laboratorio P3 a cualquier usuario que no cumpla las normas de utilización.
- Los usuarios son responsables de la limpieza y orden del laboratorio. Al terminar la utilización del mismo, y periódicamente se responsabilizarán de eliminar residuos biológicos, todos los cultivos, medios, muestras, congelados fuera de uso, etc. Se informará al Jefe del laboratorio P-3 para hacer una revisión de que todo el material ha sido eliminado correctamente y al jefe de línea/laboratorio, que es el responsable de que el personal a su cargo conozca dicha norma.

- d) Información necesaria para que la autoridad competente pueda evaluar los planes de respuesta en situación de emergencia elaborados de conformidad con el artículo 14 de la Directiva 98/81/CE.

Procedimientos de Emergencia y Evacuación

A continuación se describen los procedimientos de emergencia y evacuación específicos del laboratorio P3 y que son acordes con el nivel de riesgo biológico.

Existe un Plan de Emergencia específico para el laboratorio P3. Este Plan de Emergencia está a su vez englobado y forma parte del Plan de Emergencia general de la Facultad de Medicina, por lo que los usuarios del laboratorio deben conocer ambos protocolos y en el caso de una Emergencia General de la Facultad abandonar el laboratorio P3 y actuar siguiendo las recomendaciones del Plan de Emergencia y Evacuación de la Facultad.

En el laboratorio P3 figurará y será conocido por todos los usuarios autorizados, el plan establecido y las formas de actuación, las señales de evacuación (acústica y luminosa), así como los teléfonos de emergencia y de las personas a contactar según el tipo de accidente (ver anexo 6).

ORGANIZACIÓN

A- LÍNEA DE AUTORIDAD

- Decano de la Facultad de Medicina o Vicedecano/a de Investigación o persona en la que Delege (vicedecano/a de Investigación que a su vez es Presidente de la Comisión de Seguridad Biológica).
- Jefe/a del Laboratorio P3.
- Personal adscrito al Servicio de Prevención de Riesgos Laborales de la UAM.

B- ORGANIZACIÓN

El jefe/a del laboratorio P3 será responsable de que se mantengan las condiciones de contención primaria y secundaria, así como de que el personal expuesto esté formado y cumpla el reglamento de Funcionamiento de éste con objeto de que se reduzca la probabilidad de producción de accidentes o incidentes y el riesgo sea admisible.

El Servicio de Prevención de Riesgos Laborales de la UAM formará al personal sobre los medios portátiles y fijos de extinción de incendios, telefonía de emergencia, sistemas de alarma, vías y medios de evacuación, etc.

Así mismo, el Servicio de Prevención se encargará de gestionar el mantenimiento de los medios y sistemas indicados.

El Servicio de Salud Laboral de la Universidad realizará los reconocimientos médicos específicos (iniciales y periódicos) del personal de la UAM que trabaje en el laboratorio P3.

Así mismo, gestionará en caso de emergencia la asistencia médica (a través de la Mutua de Accidentes de Trabajo si fuera el caso) de estos trabajadores.

TIPOS DE SUCESOS

Distinguimos tres tipos de sucesos:

-Incidente: Situación en la que el riesgo aumenta ligeramente para el personal implicado, pero no para el resto del personal usuario del laboratorio (ej.: pequeños derrames de sustancias biológicas). No se producen daños a personas ni a equipos.

Estas situaciones pueden ser resueltas sin problemas por personal del laboratorio P3. Deben comunicarse al Jefe de laboratorio P3 y deben ser informadas (parte de accidentes e incidentes) al Servicio de Prevención de la Universidad.

-Accidente: Situación en la que el riesgo aumenta significativamente para el personal implicado y moderadamente para el resto del laboratorio (ej.: escape de aerosoles infecciosos, rotura de la hermeticidad de los sistemas de contención, pequeño conato de incendio). Se pueden producir daños a personas o a cosas. Se requiere la actuación de personal externo del laboratorio (ej. Servicio de Salud Laboral, Servicio de Mantenimiento, etc.).

Los accidentes deben ser comunicados además de al Jefe del Laboratorio P3, Comisión de Bioseguridad P3 y al Servicio de Prevención (parte de accidentes e incidentes).

-Emergencia: Situación en la que se produce el fallo de la totalidad o parte de los sistemas de contención y aumenta el riesgo para todo el personal del laboratorio e inclusive de zonas cercanas (ej: incendio, inundación, etc.). En estas situaciones se necesita la actuación de los servicios de emergencia exteriores en coordinación con los servicios de emergencia interiores (servicio salud laboral, servicio seguridad, servicio mantenimiento, servicio de prevención etc.). Normalmente debe evacuarse el laboratorio.

Procedimientos de actuación

En los incidentes o accidentes que impliquen la contaminación biológica y química de superficies y materiales y en aquellos accidentes que impliquen la posible contaminación del personal expuesto por inhalación de aerosoles, absorción a través de la piel o mucosas o inoculación se seguirán las siguientes normas generales además de las indicadas específicamente para cada tipo de suceso previsible.

- a) Todos los usuarios del laboratorio P3 deberán conocer el modo de actuación y la situación y correcta utilización de los diferentes medios, instrumentación y equipos de protección a utilizar en cada tipo de accidente o incidente.
- b) Cualquier accidente, incidente o emergencia debe ser comunicado al Jefe/a del laboratorio P3 y al Servicio de Prevención de Riesgos Laborales.
- c) El Servicio de Prevención de Riesgos Laborales mantendrá un registro de incidentes y accidentes e informará a las autoridades competentes si fuera necesario.

PROCEDIMIENTOS DE EMERGENCIAS Y PRIMEROS AUXILIOS

Contaminación de superficies, equipos y accidentes personales.

Ante cualquier derrame de material biológico contaminado, el primer paso es proceder inmediatamente a su limpieza, teniendo cuidado en todo momento de evitar una contaminación personal.

Los pasos a seguir son:

- Avisar mediante teléfono al Jefe del laboratorio P3 (María Jesús García García).
- Señalizar la zona contaminada y comunicarlo al resto de personal. Prevenir exposición por inhalación de aerosoles (hacer uso de máscara de nivel de protección P3) y cerrar las puertas.
- Al finalizar la descontaminación rellenar un parte de accidente/incidente y comunicárselo al Servicio de Prevención de Riesgos Laborales (ver página web del servicio o llamar al 4008)

Incidente por contaminación de superficies y materiales en condiciones de bajo riesgo.

Si el vertido se produce dentro de recintos de contención (ej: cabina de seguridad biológica) o bien fuera de ellos pero el riesgo se considera muy bajo al tratarse de pequeños derrames de muestras biológicas

en las que el agente se encuentra en baja concentración y no es aerófilo, el propio usuario descontaminará inmediatamente la superficie siguiendo estas pautas de actuación:

1º Ponerse prendas de protección personal (bata, doble guantes, calzas, pantalla de protección facial, mascarilla P3)

Utilizar frascos de desinfectante, pinzas, papel desechable, bolsas y contenedores específicos para residuos biosanitarios especiales (contenedores de polipropileno).

2º Retirar con pinzas los vidrios rotos, evitando la formación de aerosoles cubrir el derrame con papel desechable o papel absorbente.

3º Añadir desinfectante encima del derrame y del papel desechable y dejarlo actuar al menos 20 minutos.

4º El material roto y los papeles desechables se eliminarán en los contenedores apropiados para material contaminado.

5º Antes de proceder al cambio de ropa, tratarse las manos y cualquier zona expuesta con desinfectante.

- En caso de sospecha de salpicadura a los ojos, lavar con la fuente lavaojos al menos durante 15 minutos.
- En el vestuario sucio, eliminar los guantes, las calzas, la pantalla de protección facial y la mascarilla P3 en los contenedores adecuados. Quitarse la ropa presumiblemente contaminada y desecharla a los recipientes de ropa contaminada. Tratar las manos con antiséptico y pasar al vestuario limpio, donde nos colocaremos nuestra ropa.
- Cerrar herméticamente los contenedores de residuos biosanitarios y sacarlos del laboratorio P3 como se especifica en el apartado 7 de este manual.

3.1.2. Incidente por contaminación de superficies y materiales en condiciones de alto riesgo biológico:

Esta situación altamente improbable se puede producir cuando muestras biológicas en las que el agente patógeno se encuentra en alta concentración o es aerófilo (p.e. mycobacterium) se derraman fuera de un recinto de contención.

En estos casos se avisará inmediatamente por teléfono al Jefe del Laboratorio P3 y se colocará un cartel en la puerta de entrada del vestuario limpio de "NO ENTRAR BIORRIESGO CONTAMINADO", mientras se procede a la descontaminación.

La descontaminación la efectuarán los usuarios que se encuentren en el laboratorio en ese momento y se realizará con equipos de protección especiales para emergencias.

Estos equipos consisten en:

- Máscaras faciales panorámicas de alta protección equipadas con cartuchos de filtración tipo P3 de alta eficiencia para partículas y monos desechables Tyvek Proterch "C" de alta protección (tejido reforzado, costuras termoselladas y cierres de seguridad) provistos de capuchas y calzas soldadas al mono.
Este equipamiento de protección se encontrará perfectamente señalizado en el armario de seguridad situado en la sala técnica y en la antesala (al menos 2 juegos en cada armario).

- La descontaminación se realizará tal y cómo se describe para el apartado anterior de bajo riesgo, salvo que, al finalizar la retirada del vertido se procederá a la esterilización de la dependencia mediante la nebulización de un agente germicida de amplio espectro (para lo cual se utilizará un nebulizador automático que opera en ausencia de trabajadores).
- La salida del laboratorio se efectuará siguiendo el recorrido habitual (vestuario sucio). No se efectuará pulsando las setas de salida de emergencia para no romper las diferencias de presiones que aseguran que la contaminación no escapa al exterior.

3.2. Medidas a tomar en caso de contaminación personal.

La contaminación por agentes infecciosos puede ocurrir por varias vías:

- A través del aparato respiratorio. Esta vía es la más frecuente en el caso de *Mycobacterium tuberculosis*.
- A través de la piel o de las mucosas. Esta penetración se ve muy favorecida si el estado de integridad de la piel es deficiente, existiendo cortes y heridas.
- A través del aparato digestivo, por una inadecuada limpieza de las manos, onicofagia, consumo de bebidas y comidas (caramelos, chicle).
- A través de la vía parenteral, generalmente de forma accidental, por pinchazos, cortes o punciones de material cortante.

Todas las personas que tengan cualquier tipo de lesión, heridas abiertas, etc. no podrán trabajar en el laboratorio, a no ser que puedan ser totalmente protegidas de la posible exposición.

Cuando se produzca una contaminación externa se procederá de la siguiente manera:

- Quitarse las prendas contaminadas.
- Lavado (en la pila del laboratorio P3) de manos y de la zona afectada con agua tibia y desinfectante. Tener cuidado para no lesionar la piel al frotar. Insistir en uñas, espacios interdigitales, pliegues, arrugas, etc.
- En caso de contaminación en la cara se mantendrá siempre cerrados los ojos y la boca.

Descontaminación específica de otras partes del cuerpo:

- Ojos. Utilizar la ducha lavaojos durante 15 minutos.
- Boca. Enjuagar con oraldine diluido 1/10 o en su defecto con agua con sal procurando no tragar nada.
- Oídos. Lavar con abundante agua.

Inmediatamente después de proceder a la descontaminación comunicar el accidente a la Jefa del laboratorio P3 (Prof. María Jesús García García), quién asesorará sobre los pasos a seguir con la persona afectada (asesoramiento médico, traslado a centro médico, etc.).

Además, se rellenará un parte de accidentes/incidentes que será enviado al Servicio de Prevención de Riesgos Laborales (Ext: 4008, e-mail: servicio.prevencion@uam.es)

3.3. Accidente por pérdida de contención en el sistema de tratamiento de efluentes líquidos.

A parte de las situaciones de mal funcionamiento o saturación del sistema que no implican riesgo personal, y para las cuales la planta tiene suficientes medidas de seguridad y se han protocolizado

procedimientos de actuación, con bajísima probabilidad se podrían producir situaciones que impliquen la pérdida de contención del sistema por la rotura del tanque del Biowaste, de las conducciones o de los filtros.

Las normas a seguir serán las siguientes:

- El personal abandonará la dependencia siguiendo el circuito habitual (nunca accionando las setas de emergencia para romper en lo mínimo la contención del laboratorio) cerrando la puerta e impidiendo el acceso a la dependencia o zona.
- Se realizará una parada preventiva del laboratorio P3 (accionando los automáticos desde el cuadro que hay en la antesala del P3)
- El Jefe del laboratorio P3 será avisado inmediatamente y se le indicarán las circunstancias del accidente. El personal afectado permanecerá en la antesala y seguirá las indicaciones del Jefe del Laboratorio P3 en lo respectivo a descontaminación personal, asistencia a servicios sanitarios, etc.
- Tras la retirada del vertido y el control de la situación de emergencia, se procederá a la descontaminación y esterilización del laboratorio mediante el uso de fumigadores automáticos que operan en ausencia de trabajadores.

Los equipos de protección personal utilizados en este caso serán los mismos que los recomendados para accidentes de alto riesgo biológico (máscara completa, mono tyvek, guantes, etc.).

4. PLAN DE EMERGENCIA Y EVACUACIÓN

La probabilidad de un conato de incendio y más aún de un incendio generalizado se considera muy baja debido a las características constructivas del laboratorio y del edificio, a los sistemas de detección y alarma instaladas (conectados con la central de alarma de la sala de vigilancia del decanato) y a que en el laboratorio no se podrán almacenar sustancias inflamables.

El laboratorio dispone además de dos extintores de polvo ABC eficacia 21A113B.

Por otra parte, la Facultad de Medicina dispone de un Plan de Autoprotección, encontrándose el personal de la Facultad informado y formado en relación a las pautas a seguir en caso de emergencia y realizándose simulacros de evacuación periódicos.

El parque de Bomberos IX del Ayuntamiento de Madrid que cubre la zona de Fuencarral- El Pardo se encuentra situado muy próximo (Avenida Monforte de Lemos, s/n. 28029 Madrid) a la Facultad de Medicina de la UAM. Este parque, dispone de equipo de protección especial para radiactivos, químicos y biológicos.

4.1. Conato de incendio

En la actuación ante un conato de incendio se seguirá las siguientes normas:

- El personal usuario del laboratorio P3, será el responsable de sofocar el conato, utilizando los extintores portátiles que hay en la sala de máquinas y en el laboratorio.

Antes de utilizar los extintores romperá el pulsador de alarma de la sala del laboratorio de manera que queden alertados el resto de ocupantes del edificio.

Al activarse el pulsador y/o los detectores de incendio del laboratorio P3 la alarma será recibida en la central de Alarma sita en el cuarto de vigilancia exterior. Los vigilantes exteriores acudirán al laboratorio (de dos en dos si es posible) para verificar la alarma y colaborar en las tareas de extinción del conato si fuera necesario.

- Si se dispara un detector de incendios encontrándose el laboratorio vacío, la señal será recibida en la sala de los vigilantes de seguridad exterior quienes acudirán al lugar de la incidencia para verificar si se trata de una falsa alarma o de una alarma real. En caso de conato el personal de seguridad exterior romperá un pulsador de emergencia y accederá al laboratorio sofocándolo con extintores.
- Para preservar la diferencia de presiones, sólo se utilizará la salida de emergencia en caso de que el incendio se generalice y exista riesgo grave para el personal.

Para abrir los enclavamientos de las puertas del laboratorio P3 hay que pulsar las setas de emergencia.

4.2. Situación de emergencia por incendio generalizado en el laboratorio

En caso muy improbable de que se produjera una situación de estas características se actuará conforme al Plan de Autoprotección de la Facultad.

Las normas a seguir serán las siguientes:

- Declaración de emergencia a la vista del análisis de la situación. Ello se producirá cuando el incendio producido en una dependencia del laboratorio no pueda ser controlado con los medios de extinción existentes y pueda propagarse a las dependencias anexas.
- En esta situación lo primero es avisar. Romper un pulsador de emergencia y salir del laboratorio P3 utilizando las salidas de emergencia. Pulsar para ello las “setas”. Desactivar los enclavamientos electrónicos de las puertas del laboratorio P3.
- Avisar inmediatamente a Seguridad Exterior de la Facultad de Medicina (Teléfono 1108/1103) y al teléfono de emergencias en la UAM (1000).
- Avisar al Jefe/a del Laboratorio P3. El Jefe del Laboratorio P3 acudirá a la zona siniestrada y se pondrá a las órdenes del Jefe de Intervención (Seguridad Exterior) a quien asesorará sobre las características especiales del laboratorio P3. Colaborará en las tareas de evacuación de la zona.
- Una vez avisados los bomberos, el Jefe/a del laboratorio P3 se reunirá con el Jefe de Emergencia (Decano/a o Vicedecano en el que delegue) para colocarse en el Punto de Encuentro con los Bomberos y desde esta localización informar a los medios de emergencia externos sobre las peculiaridades del Laboratorio P3.
- Los bomberos actuarán asesorados por el Jefe de Emergencia y por el Jefe del Laboratorio P3 en cuanto a accesos y medios de extinción existentes y en cuanto a equipos de protección personal y medios y procedimientos idóneos de inactivación biológica. Los germicidas y medios de termonebulización y fumigación existente en el laboratorio P3 quedarán a su disposición.
- El control del personal afectado y del que ha participado en la emergencia se realizará por el servicio médico de la UAM quien coordinará la asistencia con los medios sanitarios exteriores y realizará un seguimiento de los trabajadores ingresados en hospitales si este fuera el caso.
- Todo el material utilizado para la extinción e inactivación biológica, así como la indumentaria y los equipos de protección personal de las personas afectadas y de los bomberos deberán ser inactivados biológicamente.
- Si el incendio se declara en dependencias externas y alejadas al laboratorio o en otra planta de la Facultad, el personal del P3 procederá a preparar el laboratorio para su evacuación y una vez que el



laboratorio pueda ser abandonado en condiciones de bioseguridad, se procederá a la evacuación a través del circuito normal de salida del laboratorio con objeto de no romper la hermeticidad de éste.



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

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

1) Entidad

Nombre: Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

Dirección postal: Decanato. Facultad de Medicina. C/ Arzobispo Morcillo. Nº 4. 28029 (Madrid)

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Pablo Rubio Garrido NIF: Q2818013A

Cargo: delegado del decano para seguridad en la Facultad de Medicina de la UAM

Tel: 91 497 5303

Fax:

Correo electrónico: decano.medicina@uam.es

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos:

Cargo: Profesora Titular de Universidad

Fax:

Correo electrónico: mariaj.garcia@uam.es

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

Nombre y apellidos: Vicerrector de Investigación de la UAM

Cargo: Presidente del Comité de Ética de investigación de la UAM

Tel:

Fax:

Correo electrónico: comite.eticainvestigacion@uam.es

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

[REDACTED]

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

1. Objetivo de la actividad:

El objetivo de la actividad es trabajar con mutantes en los genes *recA*, *whiB3* de la cepa H37Rv y de *Mycobacterium tuberculosis*. Los OMG se obtendrán comercialmente.

El proceso de modificación genética se ha realizado por procedimientos estándares. Los organismos modificados genéticamente tendrán una delección en los genes diana mencionados, que implica la falta de actividad de los mismos. Con los OMGs se estudiará la función de esos genes en el fenotipo persistente y latente del patógeno.

Los datos previos indican que todos ellos participan en la entrada en el fenotipo silente, por lo que su inactividad nos informará de la función que presentan cada uno de los genes.

El objetivo final es determinar si dichos genes pueden ser diana para el tratamiento o para el control de la infección latente tuberculosa.

2. Duración prevista de la actividad:

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

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. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv es la cepa-tipo de la especie para este patógeno. Se trata de la cepa de tuberculosis mas estudiada en todos los centros de investigación a nivel mundial. Proviene de un aislamiento de un paciente con tuberculosis pulmonar crónica en Nueva York, en 1905 por el Dr. Edward R. Baldwin, y nombrada como cepa H37.

Se ha mantenido en laboratorio durante muchos años mediante pases seriados de cultivo, seleccionando aquellas variantes de tipo rugoso algo mas virulentas (Rv). Por secuenciación de genomas, se han descrito algunas variantes dentro de la misma cepa.

b) Organismo donante. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Los cambios de secuencia en los genes que se estudian se han realizado experimentalmente, dichas mutaciones no se dan en la naturaleza.

- c) Inserto.
Los OMGs se adquieren comercialmente, para mas información, visitar la pagina TARGET <http://webhost.nts.jhu.edu/target/Default.aspx>.
- d) Vector.
Los OMGs se adquieren comercialmente, para mas información, visitar la pagina TARGET <http://webhost.nts.jhu.edu/target/Default.aspx>.
- e) Organismo modificado genéticamente resultante.

OMG *recA* de *M. tuberculosis* y OMG *whiB3* de *M. tuberculosis*. Los OMGs se adquieren comercialmente, para mas información, visitar la pagina TARGET <http://webhost.nts.jhu.edu/target/Default.aspx>.

- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.
Aunque se desconoce el fenotipo patógeno de los OMGs, debe considerarse que son patógenos para humanos, por lo que han de ser manipulados dentro de un laboratorio de contención de tipo 3.
Como se detalló en otros apartados, no se esperan cambios en patogenicidad y/o virulencia para ambos OMGs, La cepa original y las cepas resultantes no presentan modificaciones en genes de resistencia a antibioticos, siendo sensibles a todos los usados en clinica..
- g) Efectos para el medio ambiente.

No se espera impacto sobre el medio ambiente de ningún tipo. La supervivencia de este patógeno en el medio ambiente es muy limitada, puesto que su hospedador natural y único conocido es el hombre.

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 1	☐
Tipo 2	☐
Tipo 3	☒
Tipo 4	☐

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).

La actividad se va a llevar a cabo en el laboratorio de contención de nivel 3, por lo que los organismos modificados estarán confinados a este espacio y no saldrán en ningún momento del mismo. Siempre se manipularán dentro de las cabinas de bioseguridad existentes en el laboratorio.

El riesgo de inoculación accidental de las bacterias recombinantes es prácticamente nulo debido a la ausencia de material punzante y cortante en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica y no hay riesgo de contagio por contacto por las medidas de aislamiento que existen en la manipulación. Para evitar el contagio por vía aérea, se utilizan medios de contención como son las mascarillas de un solo uso.

b) Concentración y escala utilizadas.

El volumen máximo de pre-cultivo es de 5-10 ml en cada caso, mientras que el número de cultivos que se realizará, en volúmenes de 100ml es de tres por cada cepa en cada uno de los medios a utilizar.

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).

El manejo de células vivas de *M. tuberculosis* se realizará en un grado 3 de confinamiento y tendrá lugar en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica que pone a disposición las medidas adecuadas para descartar cualquier riesgo biológico.

Estudio de latencia:

Las bacterias (OMGs y cepa silvestre) se crecerán en un volumen de 5-10ml según el procedimiento descrito por Rodríguez y colaboradores (2014), utilizando Middlebrook 7H9 como medio de cultivo, hasta alcanzar 0,5 UDO_{600nm} momento en que el pre-cultivo se divide en dos inóculos, uno de ellos se crece en 100ml del mismo medio y el otro en 100 ml de una mezcla de ácidos grasos de cadena larga (AG-CL) y número par de átomos de carbono (ácidos oleico, palmítico y esteárico, 0,001% cada) como única fuente de carbono.

Se recogen cultivos en fase exponencial (Rodríguez *et al*, 2014), para obtener datos que servirán de referencia. Los cultivos en AG-CL se recogen también a los 30 y 60 días de incubación. La concentración máxima esperada en estos cultivos es de 0,9 UDO_{600nm}

Un lote de los cultivos que se llevan hasta los 30 días se divide en dos inóculos, uno de los cuales se somete al procedimiento clásico de hipoxia descrito por Wayne y Sohaskey (2001) hasta alcanzar la denominada fase NRP1. Para controlar el nivel de hipoxia de los cultivos, se realiza, en paralelo a estos, un cultivo suplementado con azul de metileno (1,5 μ g/ml) que se usará como indicador del nivel de depleción de oxígeno.

Estudio de persistencia:

Las bacterias (OMGs y cepa silvestre) se crecerán en dos tubos con un volumen de 10-20ml de Middlebrook 7H9 como medio de cultivo, hasta alcanzar 0,5 UDO_{600nm}. Llegado este punto, a un tubo de cada cepa se le agrega el antibiotico a concentraciones bactericidas (entre 10 y 20 veces mayor que la CIM). El duplicado de cada aislamiento se mantiene como control sin agregar antibióticos. A los 2, 4, 7 y 14 días de agregados los antibióticos se toman muestras y se siembran en medio solido por duplicado para obtener colonias aisladas en tubos sin y con antibioticos. Las UFC se cuantifican a los 40 días de cultivo.

En estas condiciones se espera que los OMGs sobrevivan aunque el número de bacterias que se recogen puede ser pequeño, debido a las condiciones de cultivo que se realizan: stress por hipoxia y antibioticos. No se espera ningún efecto sobre

el entorno físico.

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

Actividad confinada a condiciones de bioseguridad de tipo 3 (Nivel de contención 3). Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

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.)

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente es prácticamente inexistente ya que el laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios para el nivel 3 de bioseguridad.

La instalación dispone de un reglamento de funcionamiento indicado en el manual de bioseguridad, donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, para el personal usuario y que gestiona el laboratorio. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.

La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.

El clima es continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. La ubicación del laboratorio en zona de sótano produce un efecto de equilibrio en las temperaturas extremas.

- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

Vienen indicadas en los procedimientos de emergencias del Manual de Bioseguridad (apartado 7) incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

- c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.

Vienen indicados en el Manual de Bioseguridad (apartados 6 y 7) incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

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

Vienen indicados en los procedimientos de emergencias del Manual de



Bioseguridad (apartado 7) incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.