



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

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC)

Dirección postal: Jaime Roig 11, 46010 Valencia

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Jerónimo Bravo Sicilia

NIF:

Cargo: Director del IBV-CSIC

Tel:

Fax:

Correo electrónico: direccion.ibv@csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos:

NIF:

Cargo: Científica titular

Tel:

Fax: -

Correo electrónico:

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

Nombre y apellidos:

NIF:

Cargo: Técnico responsable Laboratorio P3

Tel:

Fax: -

Correo electrónico:

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

- 2) Debe señalarse si para la ejecución de esta actividad se recibe financiación del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica. 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 ☐

Si la respuesta a la pregunta anterior es **SI**, debe justificarlo especificando¹:

-Nombre de la convocatoria: Proyectos de Generación del Conocimiento 2021

- -Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: PID2021-123829NA-I00,
- -Organismo financiador: Ministerio de Ciencia e Innovación

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: 27/10/2021

b) Número de referencia del expediente: A/ES/20/I-45, (actividad A/ES/20/100). La instalación A/ES/20/I-45 está autorizada a la Fundación FISABIO-Salud Pública. El IBV-CSIC y la Fundación FISABIO-Salud Pública tienen un convenio para regular el uso compartido del laboratorio de bioseguridad P3 en relación con el desarrollo de proyectos de investigación. Se adjunta en el **Anexo I** copia de este. Asimismo, existe una coordinación de actividades empresariales entre ambos centros. En el **Anexo II** se adjunta copia de esta.

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

El presente proyecto tiene como objetivo utilizar la evolución dirigida del ribosoma de micobacterias *in vitro* para aislar genotipos exitosos bajo condiciones de exposición a antibióticos, y entender qué cambios ribosomales (a nivel de secuencia del ADN ribosomal) favorecen genotipos exitosos.

Para ello se utilizará la reciente metodología de síntesis ribosomal y evolución RISE (ribosome synthesis and evolution, ver: Hammerling et al., 2020, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14705-2>), que permite la evolución dirigida del ribosoma en un sistema libre de células (cell-free system). Brevemente, se utilizará una librería de variantes de secuencias del ARN ribosomal que se transcribirán a partir de ADN plasmídico para ser ensambladas en una librería de ribosomas. Estos ribosomas se utilizarán para traducir *in vitro* un RNA mensajero truncado que contiene una secuencia específica que provoca la parada de la traducción, de forma que únicamente los ribosomas funcionales podrán traducir este ARN mensajero hasta que se produzca la parada y el complejo terciario mRNA-ribosoma-péptido que puede ser aislado de forma selectiva usando métodos de purificación del sistema affinity-Tag. Para llevar a cabo sucesivas rondas de selección, el ARN ribosomal de los ribosomas purificados se aislará y, mediante transcripción inversa se convertirá en ADN ribosomal que se incorporará a la librería de variantes del ARN ribosomal. Tras finalizar las rondas de selección, las variantes de ARN

¹TASAS

Están exentos del pago de la tasa los casos en los que se cumplan dos requisitos, que la actividad se realice en el marco de los Planes Estatales de Investigación Científica y Técnica y de Innovación; y que se desarrolle por una institución, ente u órgano público.

ribosomal exitosas serán convertidas a ADN ribosomal y secuenciadas para detectar los cambios asociados a genotipos exitosos.

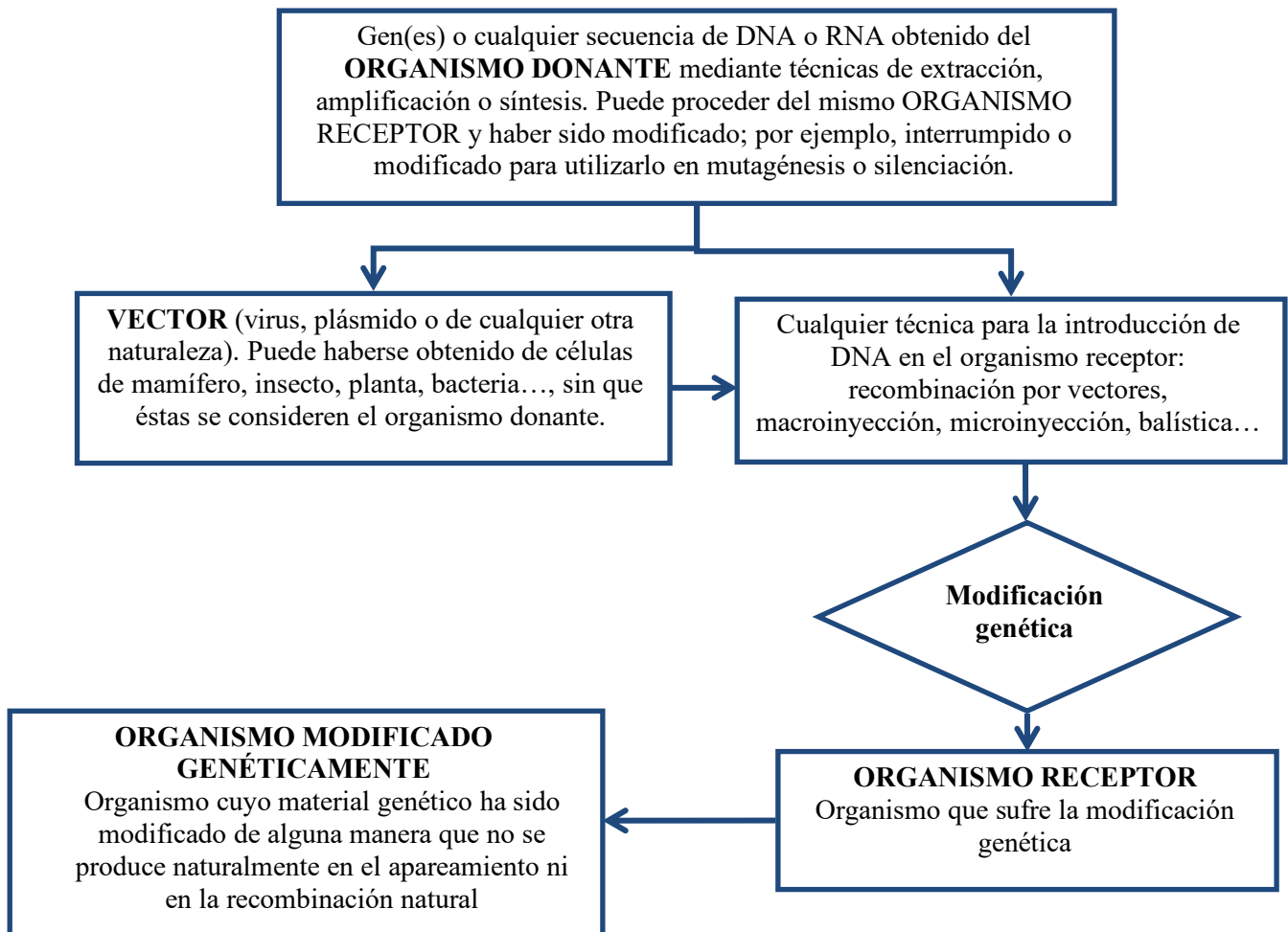
Una vez detectados genotipos exitosos y los cambios asociados, éstos se utilizarán para generar una serie de OMGs de cepas fluorescentes y/o luminiscentes de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv que contendrán versiones inducibles de los operones de ADN ribosomal. Las cepas fluorescentes y bioluminiscentes se crearán mediante la electroporación de plásmidos integrativos que contienen copias de proteínas fluorescentes (GFP o tdTomato) o luminiscentes (firefly luciferase) bajo la expresión de promotores constitutivos tal y como se detalla más abajo. Posteriormente, se utilizará la técnica de Gateway Cloning para crear cepas mutantes del operón de ADN ribosomal. Primero, se utilizará un plásmido donante para construir diversos plásmidos de entrada que contendrán las mutaciones seleccionadas del operón de ADN ribosomal. Estos plásmidos se combinarán con plásmidos de entrada que contienen los promotores y represores del sistema tetON para generar vectores de expresión regulada con integración en el cromosoma en la región att. Los plásmidos utilizados para la introducción de las proteínas fluorescentes/luminiscentes utilizarán sitios de integración en el cromosoma bacteriano distintos al sitio de integración elegido para el sistema Gateway. Las cepas creadas se testarán en condiciones *in vitro* cuantificando la generación de fluorescencia y/o luminiscencia en presencia y ausencia de inducción. El proceso se realizará íntegramente de forma confinada en el interior del laboratorio BSL3.

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: *Mycobacterium tuberculosis*

Taxonomía: Reino Bacteria, Filo Actinobacteria, Orden Actinomycetales, Familia Mycobacteriaceae, Género Mycobacteria

Nombre común: Bacilo de Koch, bacilo de la tuberculosis

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- a) Técnicas de aislamiento: *M. tuberculosis* cepa se cultiva rutinariamente sobre medio sólido en placa Petri con medio Middlebrook 7H10 o bien en 10 mL de medio líquido Middlebrook 7H9 en tubo Falcon de 50 mL a 37°C en el laboratorio BSL3. Los cultivos se almacenan congelados a -80°C en un arcón-congelador en el laboratorio BSL3, en viales de 1 mL con tapón de rosca y añadiendo 10% de glicerol como crioprotector. Todas las manipulaciones de la bacteria se realizan en cabinas de bioseguridad tipo IIA.
- b) Técnicas de identificación: La bacteria se puede identificar mediante cultivo en medio Lowenstein-Jensen observando la morfología de las colonias (secas y con aspecto grumoso) o mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. En el laboratorio se identifican cepas de tuberculosis de forma rutinaria mediante PCR específica o secuenciación.
- c) Marcadores genéticos: Secuencias específicas de *M. tuberculosis* como IS6110, secuenciación de rpoB, MIRUs.
- d) Marcadores fenotípicos: Capacidad de crecer en medio MGIT específico de micobacterias, tiempo de generación largo (24h/generación) que hace que las colonias sólo sean visibles 3 semanas tras la siembra, aspecto seco y grumoso característico de las colonias, necesidad de usar la tinción de Ziehl-Neelsen para poder teñirlas.
- e) Estabilidad genética: Estable, la bacteria no presenta elementos móviles ni casos de recombinación genética

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores: Sin modificaciones anteriores

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: El organismo puede infectar seres humanos y en menor grado animales

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.): Tipo 3

- a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad? *Mycobacterium tuberculosis* normalmente infecta las vías respiratorias. Los síntomas en caso de infección incluyen tos, fiebre y fatiga y lesiones pulmonares. Existiendo tratamiento eficaz con el que se logra la total curación.
- b) En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI ☐ NO ☒

Porqué:

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

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

La investigadora principal del grupo tiene más de 10 años de experiencia trabajando con *M. tuberculosis* en laboratorios BSL3 del Reino Unido (Francis Crick Institute y London School of Hygiene and Tropical Medicine). Además, otros grupos están trabajando con el mismo organismo en las instalaciones desde enero de 2015, cultivándolo y almacenándolo de forma rutinaria sin que haya ocurrido ningún incidente o accidente. El responsable de la instalación ha realizado los siguientes cursos en bioseguridad: “Normas de trabajo y gestión en laboratorios de contención biológica” y “Curso avanzado de formación en bioseguridad”. Así mismo lleva acumulados más de 7 años como responsable de bioseguridad de la instalación aquí referida y 3 años en una instalación similar en el Hospital General de Valencia encargada del diagnóstico de la tuberculosis.

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?:

El organismo es incapaz de multiplicarse fuera de su hospedador o de las condiciones del laboratorio. Presenta supervivencia limitada en el medio ambiente, pudiendo persistir como máximo algunos días.

En caso afirmativo:

- b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo: No hay

- | | |
|-----------------|--------------------------|
| i) esporas | ☐ |
| ii) endosporas | ☐ |
| iii) quistes | ☐ |
| iv) esclerocios | ☐ |



- v) esporas asexuales (hongos) ☐
 - vi) esporas sexuales (hongos) ☐
 - vii) otros, especifíquese
 - c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia: *M. tuberculosis* es sensible a las condiciones ambientales, tales como la luz ultravioleta, el calor y la desecación.
 - d) Posibles nichos ecológicos: Puede infectar seres humanos y ocasionalmente otros mamíferos, fuera de estos hospedadores no tiene nicho ambiental posible conocido. No se encuentra de forma natural en el ambiente.
 - e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: Incapaz de replicar fuera del hospedador
- 9) Efectos posibles sobre el medio ambiente:
- a) Implicaciones en procesos ambientales (*p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo*): Ninguno
 - b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos: Ninguna a excepción de infección en humanos con tratamiento disponible
- 10) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:
- El organismo receptor infecta poblaciones humanas en todo el mundo.
- 11) Hábitat natural del organismo:
- Es capaz de infectar humanos y otros animales.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

- 1) Nombre científico: *Photinus pyralis*, *Discosoma sp*, *Aequorea victoria*, *Mycobacterium sp*

Taxonomía: *Photinus pyralis*: Orden Coleoptera, Familia Lampyridae, Género *Photinus*; *Discosoma sp*: Orden Corallimorpharia, Familia Discosomidae, Género *Discosoma*; *Aequorea victoria*: Orden Leptothecata, Familia Aequoreidae, Género *Aequorea*; *Mycobacterium tuberculosis*: Orden Corynebacteriales, Familia Mycobacteriaceae, Género *Mycobacterium*.

Nombre común: Luciérnaga (*Photinus pyralis*), anémona (*Discosoma sp*), medusa (*Aequorea victoria*), bacilo de Koch o de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*)

- 2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: Genes reporteros de proteínas fluorescentes: GFP (green fluorescent protein) aislado de medusa y tdtomato aislado de anémona. Gen reportero de proteína firefly luciferase (FFluc) aislado de luciérnaga. Operón de ADN ribosomal de *Mycobacterium tuberculosis*. También se incluyen genes de resistencia a kanamicina, higromicina y estreptomycin de *Escherichia coli* para poder aislar e identificar los



organismos receptores que han incorporado el constructo (más información en la sección correspondiente al constructo). Estos genes reporteros son utilizados de forma generalizada en genética molecular desde hace años.

3) Método de obtención:

- a) Extracción ☐
- b) PCR ☒
- c) Síntesis *in Vitro* ☐

4) Función del gen/genes en el organismo donante: La luciferasa es una proteína peroxisomal que la luciérnaga usa para emitir destellos de luz. La green fluorescent protein (GFP) es una proteína de la medusa que emite fluorescencia verde cuando se expone a luz. TdTomato es una proteína fluorescente derivada de la anémona y que emite fluorescencia en el espectro naranja. El operón de ADN ribosomal de *M. tuberculosis* está compuesto por los genes *rrs* y *rrl* (loci MTB000019 y MTB000020) y codifica los ARN ribosomales que se utilizan en el ensamblaje de ribosomas, necesarios para la síntesis de proteínas.

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

SI ☒ (*M. tuberculosis*) NO ☐

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

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

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad? *Mycobacterium tuberculosis* normalmente infecta las vías respiratorias. Los síntomas en caso de infección incluyen tos, fiebre y fatiga y lesiones pulmonares. Existiendo tratamiento eficaz con el que se logra la total curación.

c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo? No

6) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural? No

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

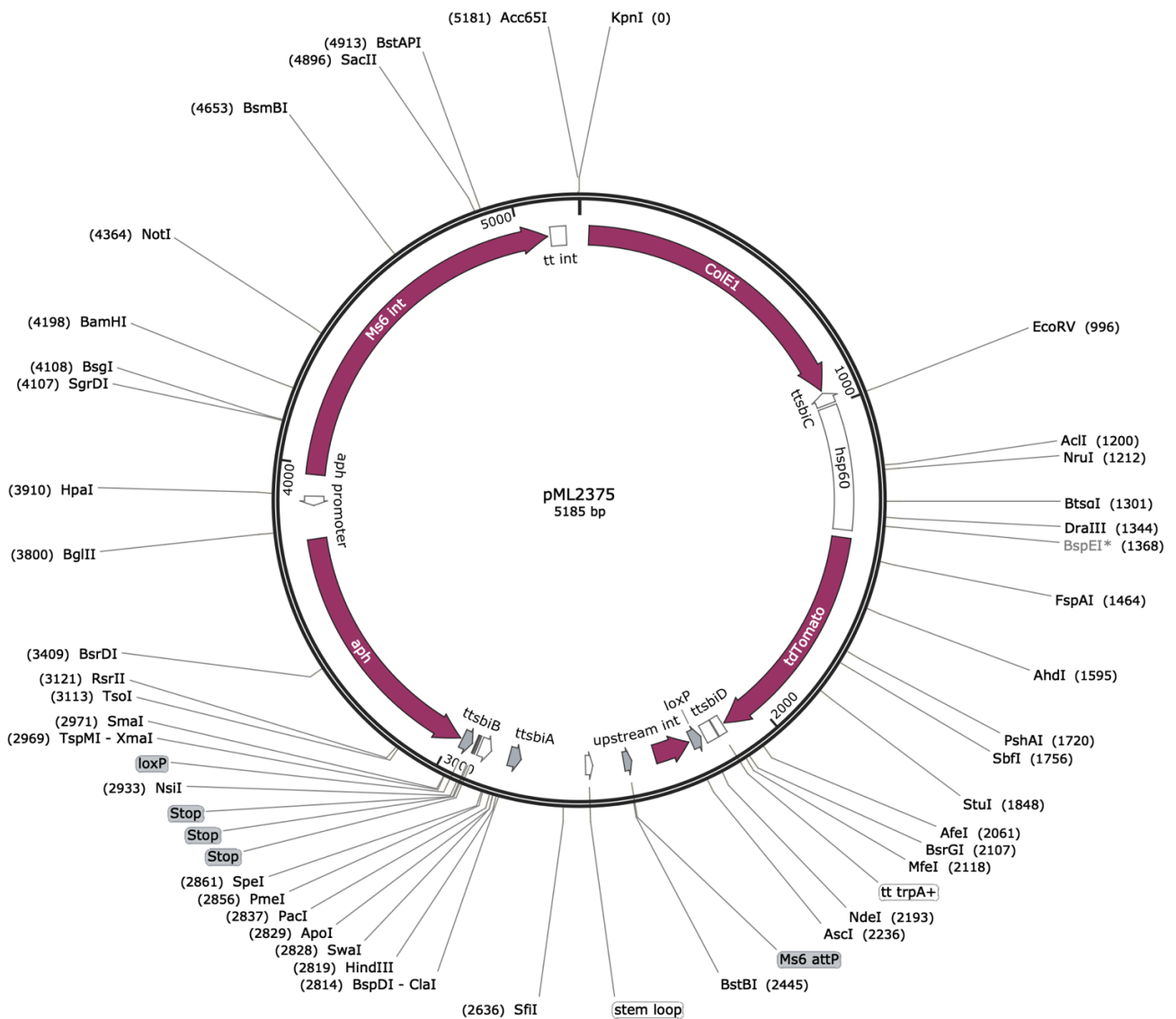
- a) Inserción de material genético ☒

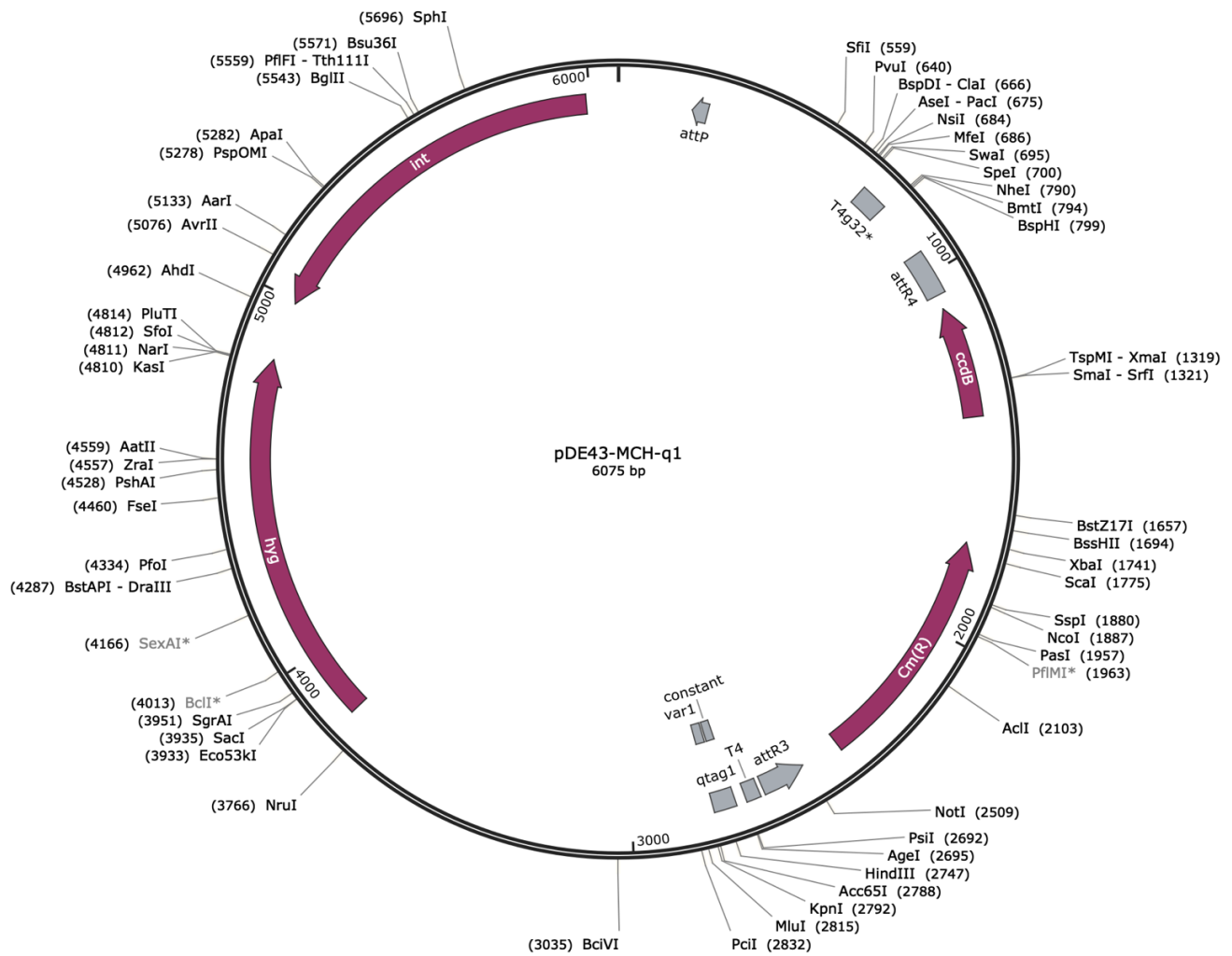
- b) Deleción de material genético ☐
- c) Sustitución de bases ☐
- d) Fusión celular ☐
- e) Otros, especifíquese
- 2) Finalidad de la modificación genética: El operón de ADN ribosomal de *M. tuberculosis* está compuesto por los genes *rrs* y *rrl* (loci MTB000019 y MTB000020). Se insertarán secuencias mutadas del operón de ADN ribosomal que serán identificadas en los experimentos de evolución dirigida. Para la generación de la librería de variantes de secuencias del ARN ribosomal, nos centraremos en la introducción de mutaciones en las zonas correspondientes a los centros peptidiltransferasa (por ejemplo, la zona comprendida entre las bases 1962 y 2575 en la numeración de *Escherichia coli*) y decodificador del ribosoma, donde habitualmente se encuentran situadas las dianas de antibióticos. Las secuencias mutadas serán amplificadas a partir de cDNA recuperado de los experimentos de evolución dirigida, mediante PCR incluyendo extremos que faciliten la integración en el sitio L5 para el sistema Gateway. También se insertarán de manera individual las secuencias correspondientes a reporteros traduccionales fluorescentes y luminiscentes (proteínas GFP, tdTomato y firefly luciferasa) para la cuantificación de los efectos asociados a las mutaciones seleccionadas
- 3) Método utilizado para llevar a cabo la modificación genética: El método utilizado para generar el OMG es la transformación mediante electroporación. Brevemente, se introduce el plásmido en el organismo receptor usando un electroporador y se incuba la mezcla en medio nutritivo a 37°C durante la noche para permitir la integración del inserto en el sitio de integración elegido del genoma de la bacteria. Finalmente, se siembra sobre medio sólido con el antibiótico de selección adecuado para seleccionar aquellas bacterias que hayan incorporado el constructo en su genoma. Para más detalles, ver Wong and Rock, 2021, *Methods in molecular biology*, 2314, 343-364
- 4) ¿Se ha utilizado un vector en el proceso de modificación?
- SÍ ☒ NO ☐
- En caso afirmativo:
- a) Tipo e identidad del vector: Se utilizarán vectores integrativos con sitios de integración de micobacteriófagos L5 y Ms6.
- b) Si se trata de un virus:
- Es defectivo en replicación SÍ ☐ NO ☒
- 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*)

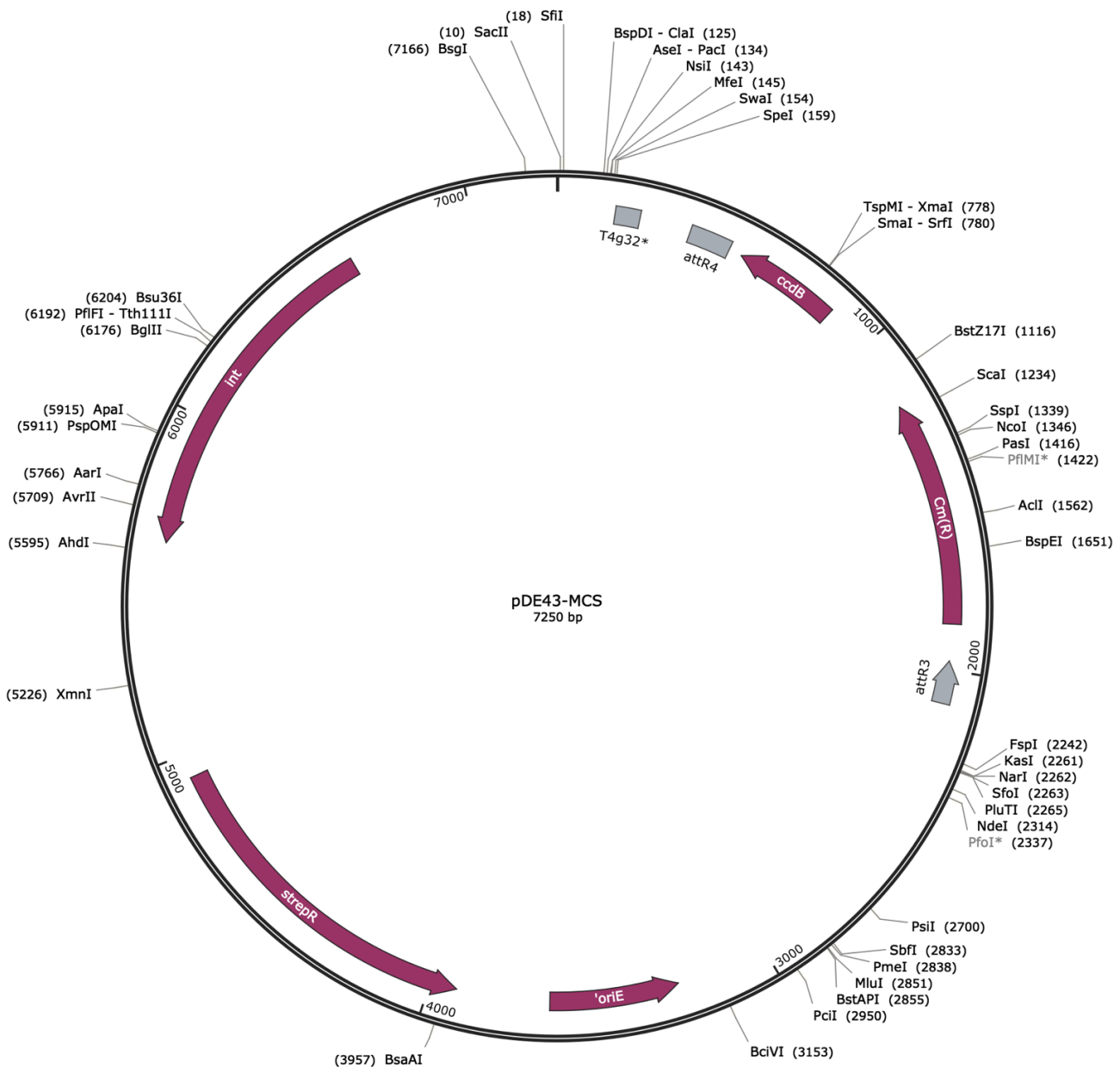


Tal y como se detalla a continuación, como primera opción se plantea utilizar plásmidos integrativos que se insertan en los sitios de integración de fagos L5 y Ms6 para generar los OMGs con variantes del operón de ADN ribosomal y reporteros traducionales.

Nombre	Uso/inserción	Resistencia	Comentario	Referencia
pML2375	phsp60-tdTomato, Ms6	Kanamicina	Reportero tdTomato	Ver mapa de restricción
pML2300	psmyc-gfpm2+, Ms6	Kanamicina	Reportero GFP	10.1016/j.gene.2010.07.012
pMV306hsp+FFluc	Phsp60-FFluc, attL5	Kanamicina	Reportero firefly luciferase	https://www.addgene.org/26156/
pDO023A	Plásmido donante	Ampicilina	Para construir plásmidos de entrada Gateway, L5	https://www.addgene.org/27367/
pEN12A-P1	Promotor para tetON, attL5	Ampicilina	Plásmido de entrada Gateway, L5	https://www.addgene.org/27366/
pEN41A-T10M	Represor para tetON, attL5	Ampicilina	Plásmido de entrada Gateway, L5	https://www.addgene.org/27365/
pDE43-MCH-q1	Plásmido de destino, attL5	Higromicina	Plásmido destino Gateway, L5. Incluye q1 tag	Ver mapa de restricción
pDE43-MCS	Plásmido de destino, attL5	Estreptomicina	Plásmido destino Gateway, L5	Ver mapa de restricción







d) Gama de hospedadores del vector: Bacterias del genero *Mycobacterium*

e) Características de la movilidad del vector:

- i) factores de movilización: integrasas específicas que permiten la inserción del vector en el genoma bacteriano.
- ii) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas? Son fagos líticos carecen de fase lisogénica. Además, al ser incapaz de replicarse a 37°C es posible eliminarlo completamente del organismo receptor



- iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos? Sólo pueden transferir el constructo a especies del género *Mycobacterium* y carecen de marcadores de resistencia por sí mismos.

5) Información del inserto:

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

Se insertarán secuencias mutadas del operón de ADN ribosomal que serán identificadas en los experimentos de evolución dirigida. Las secuencias mutadas serán amplificadas a partir de cDNA recuperado de los experimentos de evolución dirigida, mediante PCR incluyendo extremos que faciliten la integración en el sitio L5 para el sistema Gateway.

También se insertarán de manera individual las secuencias correspondientes a reporteros traduccionales fluorescentes y luminiscentes (proteínas GFP, tdTomato y firefly luciferasa) para la cuantificación de los efectos asociados a las mutaciones seleccionadas.

- b) Descripción del método utilizado para la transformación: El método utilizado para generar el OMG es la transformación mediante electroporación. Brevemente, se introduce el plásmido en el organismo receptor usando un electroporador y se incuba la mezcla en medio nutritivo a 37°C durante la noche para permitir la integración del inserto en el sitio de integración elegido del genoma de la bacteria. Finalmente, se siembra sobre medio sólido con el antibiótico de selección adecuado para seleccionar aquellas bacterias que hayan incorporado el constructo en su genoma. Para más detalles, ver Wong and Rock, 2021, *Methods in molecular biology*, 2314, 343-364
- c) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto: Los únicos genes estructurales presentes en los diferentes insertos son los correspondientes a resistencia a kanamicina, higromicina y estreptomycin, dependiendo del vector utilizado.
- d) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto: Los diferentes vectores incluyen regiones flanqueantes de los sitios de integración, promotores de fago o micobacteria para la expresión constitutiva y orígenes de replicación tal y como se especifica en la tabla de vectores.
- e) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente? No, la secuencia dependerá de las variantes del operón de ADN ribosomal seleccionadas.
- f) ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese. No, todas las secuencias son necesarias
- g) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese. No



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? No

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?: Si

En caso afirmativo:

i) número de copias: Copia única

ii) localización cromosómica: sitios integración fagos L5, y Ms6 dependiendo del vector (ver tabla).

iii) secuencias colindantes: parte de las secuencias de integración

c) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?: No afecta a la expresión de otros genes.

d) Si se trata de un virus:

i) La inserción es específica ☐

ii) La inserción se produce al azar ☐

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas ☐

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

iv) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación) ☒

v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA) ☒

vi) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas) ☒

Se comprobará la inserción del producto deseado mediante PCR y secuenciación. Además, se cuantificará el efecto que la modificación tiene en la producción de mRNA (mediante PCR cuantitativa) y síntesis de proteínas (mediante cuantificación de fluorescencia y/o luminiscencia) tras la inducción de la expresión.



- 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: No, no se han descrito mutantes de dicha cepa o de otras cepas de tuberculosis que le permitan llevar un estilo de vida libre.
 - b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese: Esperamos que algunos de los mutantes tengan capacidad alterada de crecer en cultivo celular en el laboratorio, así como consecuencias en la eficiencia de traducción de proteínas ya que son mutaciones en el operón de ADN ribosomal. Estas propiedades se pueden medir al generar el organismo modificado genéticamente. No esperamos modificaciones de la patogenicidad, ya que no se han descrito mutantes de ese tipo en estas cepas y las mutaciones que las hacen avirulentas son múltiples y complejas.
 - c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar: No es esperable que se produzcan incrementos relevantes en patogenicidad, ya que la alteración es disrupción de un gen ya presente en el genoma.
 - d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese: No, puesto que la modificación no le permitirá a la bacteria llevar un modo de vida libre
 - e) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese: No aplica
 - f) Marcadores específicos del OMG: Contendrán insertos de secuencia conocida, así como marcadores fluorescentes y/o luminiscentes y de resistencia a antibióticos que permitirán la rápida caracterización.
- 3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*): Los OMGs son estables indefinidamente
- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos: Los insertos no pueden cambiar de sitio tras la integración porque carecen de medios para movilizarse. Los genes de resistencia utilizados no aumentan la virulencia ni la patogenicidad. El resto de las secuencias no cambian la virulencia, patogenicidad o resistencia a antibiótico.
- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
 - a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: El OMG posee una secuencia específica conocida que es aquella del inserto. La presencia y ubicación del inserto puede determinarse por PCR específica o secuenciación. Además, los marcadores fluorescentes y/o luminiscentes pueden utilizarse para su identificación.

- b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: Las bacterias electroporadas con los diferentes insertos se aislarán mediante cultivo selectivo en medio con antibióticos de selección. Una vez aislados, se manejarán y cultivarán exclusivamente en el interior del laboratorio BSL3 en cabinas de bioseguridad tipo III. Los cultivos se realizarán de forma rutinaria sobre medio Middlebrook 7H10 agar en placa petri o en medio líquido Middlebrook 7H9 en tubos de 50 mL (volumen cultivo = 10 mL) o en botellas de cultivo (volumen cultivo 100 mL).

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: se cultivará sobre agar en placa petri, en tubos falcon con 10 mL de cultivo o en botellas con 100 mL de cultivo líquido a una densidad de 10^8 - 10^9 cfu/mL.
- b) Número de plantas:
- c) Número de animales:

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada: Del 01/09/2022 al 31/08/2025. Estas actividades se van a realizar mediante la financiación obtenida a través del proyecto del MINECO PID2021-123829NA-I00.

(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).

- 4) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados: El objetivo final de la actividad es utilizar la evolución dirigida del ribosoma de micobacterias *in vitro* para aislar genotipos exitosos bajo condiciones de exposición a antibióticos, y entender qué cambios ribosomales (a nivel de secuencia del ADN ribosomal) favorecen genotipos exitosos. Una vez detectados genotipos exitosos y los cambios asociados, éstos se utilizarán para generar una serie de OMGs de cepas fluorescentes y/o luminiscentes de *M. tuberculosis* H37Rv que contendrán versiones inducibles de los operones de ADN ribosomal. Esta actividad nos permitirá entender a nivel molecular cómo cambios en la secuencia del ADN ribosomal afectan a la traducción de proteínas y cómo evoluciona la resistencia a antibióticos.
- 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. En el caso de centros españoles, indicar el número de notificación si se conoce: El OMG se generará de forma contenida dentro de las instalaciones

- 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 aplicable² (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*): No aplicable ya que el OMG se generará en nuestras instalaciones y no necesitará ser transportado
- 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*): Toda manipulación del OMG se realizará en una cabina de bioseguridad tipo III en el interior del laboratorio BSL3. La manipulación la hará siempre personal formado específicamente para el trabajo con este tipo de microorganismos y siguiendo procedimientos normalizados de trabajo (PNT). El cultivo se realizará preferentemente en placa petri o en tubo Falcon con volumen de cultivo de 10 mL (10^8 - 10^9 cfu/mL) con doble contención. Puntualmente será necesario usar un volumen de trabajo de 100 mL y se trabajará de forma especialmente cuidadosa en esos casos. Se trabajará siempre con equipo de protección individual desechable o autoclavable (buzo, guantes, calzas, capuz con respirador y manguitos). Todos los residuos generados en cada manipulación serán inactivados químicamente y autoclavados inmediatamente.
- 8) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse: El trabajo a realizar con los OMGs obtenidos se realizará en el Laboratorio BSL3. Dicho laboratorio consta de 7 salas de acceso consecutivo conectadas entre sí por un sistema de puertas con entrada y salida independientes, provistas de ventilación continua con presión negativa y de filtros HEPA en la salida de aire. Las tres primeras salas están destinadas al acceso exclusivo de personas, para el cambio de ropa y protección con Equipos de Protección Individual (EPI), la sala intermedia actúa de corredor comunicando con los laboratorios y las tres últimas salas están destinadas a realizar trabajos de microbiología con patógenos bacterianos que requieren nivel de bioseguridad 3. El conjunto dispone de un circuito cerrado de televisión que permite la observación del operador desde el exterior y está desprovisto de fregaderos o sumideros. Esta instalación es descontaminada al menos una vez cada tres meses con un sistema de dispersión (Nouvair) que elimina microorganismos en el ambiente, cabinas y encimeras. El acceso a la instalación está restringido al personal autorizado mediante acceso electrónico y siempre bajo la supervisión del técnico encargado.

² Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- **(ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas)** del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones
- **Reglamento (CE) n° 1/2005** del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas 64/432/CEE y 93/119/CE y el Reglamento (CE) n° 1255/97.
- **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 [Diario Oficial L 287 de 5.11.2003].
- **Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad**. Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: <https://bch.cbd.int/protocol/>

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales: No se encuentra cerca de una fuente de peligro potencial
- 2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes: No aplica
- 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: Todas las actividades (generación, manejo y almacenamiento de OMG) van a realizarse exclusivamente en el interior del laboratorio BSL3.

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

- 1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio: Todos los trabajadores deben conocer y aplicar los protocolos normalizados de trabajo en todo momento dentro de las instalaciones. Toda esta información puede encontrarse en la notificación A/ES/20/I-45. Periódicamente, el responsable del laboratorio reforzará dichas prácticas mediante entrenamiento y evaluación de los trabajadores
- 2) Formación del personal adscrito: El responsable del laboratorio ha realizado los siguientes cursos en bioseguridad: “Normas de trabajo y gestión en laboratorios de contención biológica” y “Curso avanzado de formación en bioseguridad” Asimismo, cuenta con 7 años como responsable de bioseguridad de la instalación aquí referida y 3 años en una instalación similar en el Hospital General de Valencia encargada del diagnóstico de la tuberculosis. Durante los cuales no se registró ninguna incidencia. Al resto de personal se le somete a un entrenamiento previo, consistente en formación teórica y un entrenamiento práctico con microorganismo no patógeno. La duración total de la formación la estimará el responsable del laboratorio en función de un ejercicio práctico evaluable que deberá ser superado por el personal para poder desempeñar su trabajo en el laboratorio BSL3
- 3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación: La limpieza y desinfección de superficies de trabajo es inmediatamente después de terminar de trabajar. Semanalmente se realizará una limpieza y desinfección de todas las superficies del laboratorio. Todo ello se realiza con el germicida Limoseptol FA al 20% y con etanol al 70%, además de irradiar la cabina con luz UV durante una hora al finalizar el trabajo. La limpieza y desinfección de la cabina de seguridad es siempre al comenzar y terminar el trabajo. Con una periodicidad quincenal se le realizará una limpieza y desinfección completa. Todo ello realizado también con el germicida limoseptol FA y etanol al 70% También disponemos de un nebulizador “Nouvair” de Jose Collado S.A. para la descontaminación de todo el laboratorio mediante peróxido de hidrogeno y acido peracético (F66-SR).
- 4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento: Revisiones anuales del sistema de ventilación y cabinas de seguridad biológica por empresa externa. Adjuntado último informe de cualificación. La eficacia del autoclave se verifica mediante el uso en cada carga de indicadores químicos de esterilización y mensualmente mediante indicadores biológicos, además de realizar una validación anual por empresa externa

5) Programas de inspección y control del confinamiento: Diariamente, el operario está obligado a comprobar visualmente el nivel de la presión negativa de toda la sala de contención nivel 3 antes de entrar a trabajar. Existen tres pantallas informativas, una antes del BSL2, una antes del BSL3 y otra dentro de la sala de esterilización. Además, en caso de fallo de las pantallas, existen 3 manómetros situados encima de la puerta de cada laboratorio (1,2 y 3) Miden la diferencia de presión entre la sala de esterilización y los laboratorios, que debe ser de -20Pa. De todas maneras, cuando la presión baja de ese margen se dispara una alarma luminosa y acústica que avisa de ello. A su vez, el responsable del laboratorio, el servicio de Seguridad y el de Mantenimiento disponen de un control y registro informático diario de las temperaturas, caudales y presiones mediante sistema Metasys de gestión del Laboratorio.

La comprobación de las cabinas de seguridad biológica también es diaria y siempre antes de empezar a trabajar. En este caso las propias cabinas disponen de una pantalla que indica mediante alarma acústica y cambio de color si las velocidades de extracción y de barrera son las correctas. De todas maneras, el operario debe comprobar visualmente si los valores de velocidad de extracción y de barrera son los indicados en el protocolo (P3-PNT.02). A su vez, las cabinas también tienen indicadores del nivel de saturación del filtro HEPA que avisan de cuando es necesario cambiarlo.

Adicionalmente, todas las puertas de acceso están enclavadas por lo que nunca puede haber contacto entre el área de contención 3 y el exterior. Este enclavamiento también está controlado por el sistema Metasys de gestión del laboratorio

X. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1) Encargado de la gestión de residuos:

- | | | | | |
|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|
| a) gestión interna: | SÍ | ☐ | NO | ☒ |
| b) gestión por una empresa externa: | SÍ | ☒ | NO | ☐ |

Si es el caso, nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:
Consenur S.L.

2) Inactivación de residuos: método, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados: Los residuos sólidos son inactivados por inmersión en germicida limoseptol FA al 20% y mantenidos al menos un minuto (tiempo validado de actuación) una vez desinfectados son autoclavados y acumulados en contenedores homologados y etiquetados como residuos biosanitarios de tipo III de 60L que serán recogidos por la empresa gestora de residuos Consenur S.L. Los residuos líquidos serán mezclados dentro de la cabina y en contenedores preparados para líquidos con la suficiente cantidad de germicida limoseptol FA para que la concentración final de desinfectante no baje del 15%. Una vez llenas las $\frac{3}{4}$ partes, el contenedor será desinfectado con germicida, autoclavado y entregado a la empresa gestora de residuos Consenur S.L.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente: Un accidente podría producirse por rotura de tubos, derrames accidentales o contacto a través de mucosas con aerosoles que contuvieran el



microorganismo. Para evitar esto, existen protocolos de trabajo, equipos de protección individual y protocolos de actuación frente a accidentes (P3-PNT.05 y 06). En caso de no haberse podido evitar el accidente y en función de la gravedad de este se optará por llamar al 112 o ser atendido en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (Avenida Blasco Ibáñez nº 17) y se le aplicará el protocolo ante accidente biológico.

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Para el trabajo con organismos modificados genéticamente el equipamiento de seguridad se compone de:

- Monos con calcetines Tyvek
- Capuz 3M
- Sistema de ventilación autónoma Jupiter de 3M
- Guantes largos (40cm) de nitrilo
- Guantes de nitrilo
- Zuecos rígidos Calzuro
- Manguitos largos LicuaStop

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores: A todo operario que va a comenzar a trabajar en el laboratorio BSL3 se le hace entrega de la colección de protocolos normalizados de trabajo, donde puede aprender de una manera específica y concreta todos los pasos a seguir para realizar cualquier trabajo básico dentro del laboratorio. Además, también se le entrega el “Plan de contingencia del laboratorio P3” donde aparecen todos los pasos a seguir en caso de riesgo ajeno a él.

El operario firma un escrito donde certifica la lectura y comprensión de los citados documentos, además de responsabilizarse de la información que contienen.

Obviamente, aparte de toda la información escrita se le somete a un entrenamiento y a una evaluación antes de poder empezar a trabajar

4) Planes de emergencia: Plan de contingencia del laboratorio BSL3 y protocolo normalizado de trabajo 05 y 06 – Derrames e incidentes y Accidentes y emergencias. Ambos protocolos se adjuntaron en la notificación A/ES/20/I-45.



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

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

- 1) Entidad
Nombre: Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC)
Dirección postal: Jaime Roig 11, 46010 Valencia
- 2) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: Jerónimo Bravo Sicilia
NIF:
Cargo: Director del IBV-CSIC
Tel:
Fax:
Correo electrónico: direccion.ibv@csic.es
- 3) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos:
NIF:
Cargo: Científica titular
Tel:
Fax:
Correo electrónico:
- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
Nombre y apellidos:
NIF:
Cargo: Técnico responsable Laboratorio P3
Tel:
Fax:
Correo electrónico:
- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto:

II.

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

(En el caso de que se notifiquen varias actividades de tipo 1, deberá rellenarse este apartado y adjuntar un cuadro resumen en que se recojan todas las actividades, según el modelo que figura en el anexo).

1) Objetivo de la actividad:

Evaluar el efecto que mutaciones en el operón de ADN ribosomal tienen en la traducción de reporteros fluorescentes y/o luminiscentes en la cepa de referencia *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

2) Duración prevista de la actividad: 01/09/2022 – 31/08/2025

(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).

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).

(En el caso de actividades de tipo 1 se incluirá en este apartado un listado de los principales organismos y material genético utilizados (organismos receptores, organismos donantes, insertos, vectores y organismos modificados genéticamente resultantes), así como la evaluación del riesgo para la salud humana y el medio ambiente de los mismos).

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. Se trata de una cepa de laboratorio de *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* normalmente infecta las vías respiratorias. Los síntomas en caso de infección incluyen tos, fiebre, y fatiga y lesiones pulmonares. Existente tratamiento eficaz con el que se logra la total curación.
- b) Organismo donante. Los organismos donantes *Photinus pyralis* (luciérnaga), *Discosoma sp* (anémona), *Aequorea victoria* (medusa), no presentan ninguna propiedad nociva. *Mycobacterium tuberculosis*, tal y como se indica arriba, es un patógeno humano que ocasiona principalmente lesiones pulmonares.
- c) Inserto. El inserto corresponde al operón de ADN ribosomal, compuesto por los genes *rrs* y *rrl* de *M. tuberculosis*. Adicionalmente se insertarán de manera individual las secuencias correspondientes a reporteros traduccionales fluorescentes y luminiscentes (proteínas GFP, tdTomato y firefly luciferasa). Ninguno de estos insertos altera las propiedades nocivas del organismo receptor.

- d) Vector. Todos los vectores utilizados se integran en el cromosoma bacteriano. La expresión del inserto correspondiente al ADN ribosomal no será constitutiva, sino que se activará en respuesta a tratamiento con tetraciclina. Se detalla información de los vectores propuestos en parte A.
- e) Organismo modificado genéticamente resultante. Esperamos que algunos de los OMG tengan capacidad alterada de crecer en cultivos in vitro de laboratorio ya que las mutaciones afectan al operón de ADN ribosomal.
- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal. No es esperable que se produzcan incrementos relevantes en patogenicidad, ya que la copia nativa del operón de ADN ribosomal se mantiene y la copia con mutaciones no se expresa de forma constitutiva.
- g) Efectos para el medio ambiente. Ninguno, puesto que las modificaciones no permiten a la bacteria llevar un modo de vida libre.

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).

Toda la manipulación se realizará dentro del laboratorio de nivel de contención 3 y a su vez dentro de cabinas de bioseguridad tipo IIA. El laboratorio está dotado de un sistema de presión negativa y salidas de aire con filtros HEPA. Asimismo, las instalaciones disponen de un equipo de esterilización por peróxido de hidrógeno. Adicionalmente, el operador irá equipado con equipo de protección individual para la manipulación de agentes biológicos de grupo de riesgo 3.

Existen procedimientos normalizados de trabajo conocidos por el personal que forma parte del proyecto, así como protocolos de actuación en caso de incidentes, accidentes y emergencias.

Los trabajadores del proyecto recibirán formación e información sobre los riesgos de sus puestos de trabajo y las medidas preventivas a adoptar, así como sobre los planes de emergencia del centro.

- b) Concentración y escala utilizadas.

El proceso se realizará a escala experimental, con un máximo de 100ml de cultivo.

- 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).

Los cultivos se realizarán en cabinas de flujo laminar tipo IIA, dentro del laboratorio P3 y teniendo en cuenta las medidas preventivas necesarias en la realización de cualquier operación en este tipo de laboratorios. El almacenamiento se hará teniendo en cuenta las medidas de confinamiento apropiadas. Por todo ello, no es previsible que los cultivos de OMG produzcan efectos nocivos ni se liberen al entorno.

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

Agentes biológicos de grupo de riesgo 3. Es necesario un nivel de contención 3 para proteger la salud humana o animal y proteger 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).

No es previsible que los OMG objeto de estudio produzcan efectos nocivos en la salud humana o animal, ni sobre el medio ambiente, dadas las condiciones de manipulación de los mismos y las condiciones de confinamiento a las que son sometidos en las instalaciones.

Toda manipulación será realizada en una cabina de bioseguridad tipo IIA situada dentro del laboratorio de biocontención nivel 3 y será siempre realizada por personal especializado, autorizado y entrenado para el trabajo con este tipo de microorganismos.

Será obligatorio el cambio de ropa de trabajo, colocándose en el momento de entrar a trabajar los equipos de protección individual necesarios para la manipulación, situados en la sala “Vestuario” y de uso exclusivo en el laboratorio P3.

La instalación cuenta con un autoclave, un SAS biológico, un biowaste, germicidas químicos testados y un equipo portátil de descontaminación mediante peróxido de hidrógeno.

Los residuos generados, tanto líquidos como sólidos, son inactivados y esterilizados respectivamente antes de ser entregados, en contenedores cerrados y etiquetados como residuos biopeligrosos, a la empresa gestora Consenur S.L.

Existen procedimientos normalizados de trabajo para los casos de incidentes, accidentes y emergencias.

- a) Información adicional relativa a la ubicación de la instalación (proximidad a fuentes de peligro potenciales, condiciones climáticas predominantes, etc.) El laboratorio P3 está situado en la planta sótano del edificio y no se encuentra próximo a fuentes



de peligro potenciales. Está ubicado en una zona climatizada y dotada de sistemas de eliminación de aire con control microbiológico mediante filtros HEPA.

Respecto a las condiciones climáticas, predomina el clima Mediterráneo con inviernos no muy fríos y veranos largos y bastante secos y calurosos, con máximas en torno a los 30°C. Las precipitaciones se concentran en primavera y otoño, con riesgos de gota fría frecuentes.

Las posibilidades de una liberación accidental son mínimas debido a los equipos de sistemas empleados en la manipulación del microorganismo y a los protocolos establecidos para la inactivación y eliminación de residuos

Condiciones en las que podría producirse un accidente. Un accidente podría producirse por rotura de tubos, derrames accidentales o contacto a través de mucosas con aerosoles que contuvieran el microorganismo. Para evitar esto, existen protocolos de trabajo, equipos de protección individual y protocolos de actuación frente a accidentes (P3-PNT.05 y 06). En caso de no haberse podido evitar el accidente y en función de la gravedad del mismo se optará por llamar al 112 o ser atendido en el Hospital Clínico Universitario de Valencia (Avenida Blasco Ibáñez N.º 17) y se le aplicará el protocolo ante accidente biológico. En el **Anexo III**, se adjunta el protocolo de procedimientos de acceso y salida a la instalación. Asimismo, se proporciona el informe emitido por la Fundación FISABIO-Salud Pública al Comité Nacional de Bioseguridad para autorizar la instalación en el **Anexo IV**.

- b) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales. El acceso está limitado al personal que tiene la formación necesaria para trabajar con microorganismos de nivel 3. Este personal recibe un código de acceso. El laboratorio tiene un sistema de videovigilancia, teléfono y sistema de alarma.

Consta con varias medidas de protección y confinamiento:

- Manipulación de microorganismos en cabinas de bioseguridad tipo IIA con triple etapa de filtración
- Autoclave
- SAS
- Equipo portátil de descontaminación mediante nebulización
- Sistema de presión negativa
- Esclusa de entrada y salida independientes
- Luz UV en cabinas
- Mono de trabajo y sistema respirador
- Doble guante de nitrilo

- c) Planes de emergencia.



Plan de contingencia del laboratorio P3 y protocolo normalizado de trabajo 05 y 06
– Derrames e incidentes y Accidentes y emergencias. Ambos protocolos se adjuntaron en la notificación A/ES/20/I-45.