



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

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

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

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Lucía Soriano Martínez
NIF: 02550317-P
Cargo: Directora Gerente
Tel: 976716891
Fax:
Correo electrónico: lsorianom@cita-aragon.es / lsorianom@aragon.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Pilar M^a Muñoz Álvaro
NIF: 08917172-A
Cargo: Investigadora
Tel: 976716460
Fax:
Correo electrónico: pmmunnoz@cita-aragon.es

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

Nombre y apellidos: Lucía Soriano Martínez
NIF: 02550317-P
Cargo: Directora Gerente
Tel: 976716891
Fax:
Correo electrónico: lsorianom@cita-aragon.es / lsorianom@aragon.es

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

Pilar M^a Muñoz Álvaro



- 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 I+D+i Retos Investigación 2019

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: *Ovine brucellosis: B. ovis and B. melitensis safe vaccines and DIVA strategies (Bru-DIsafe)*. PID2019-107601RB-C31

IP: Pilar M^a Muñoz Álvaro (CITA-Aragón)

-Organismo financiador: Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades

- 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:

30/10/15 (Laboratorio P3)

16/10/17 (Ratonario P3)

- b) Número de referencia del expediente:

A/ES/15/I-17 (Laboratorio P3)

A/ES/17/I-30 (Ratonario P3)

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

Manipulación e inoculación en animales experimentales (ratón) de varios OMG de tipo 3 derivados de *B. melitensis* y *B. microti* (descritos en el punto III), cuya obtención se realiza en la Universidad de Navarra (en adelante, UNAV), tras su notificación a la CNB con resolución favorable (A/ES/22/88).

Las actividades concretas a realizar son:

(1) Preparación de inóculos (suspensión bacteriana de 1-5mL con concentración máxima de 10^{10} UFC/mL) de los OMG tipo 3 notificados.

(2) Inoculación intraperitoneal o subcutánea en ratones de experimentación con los inóculos mencionados en (1).

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.



1) Finalidad de la actividad:

Obtención de vacunas vivas atenuadas frente a la brucelosis animal

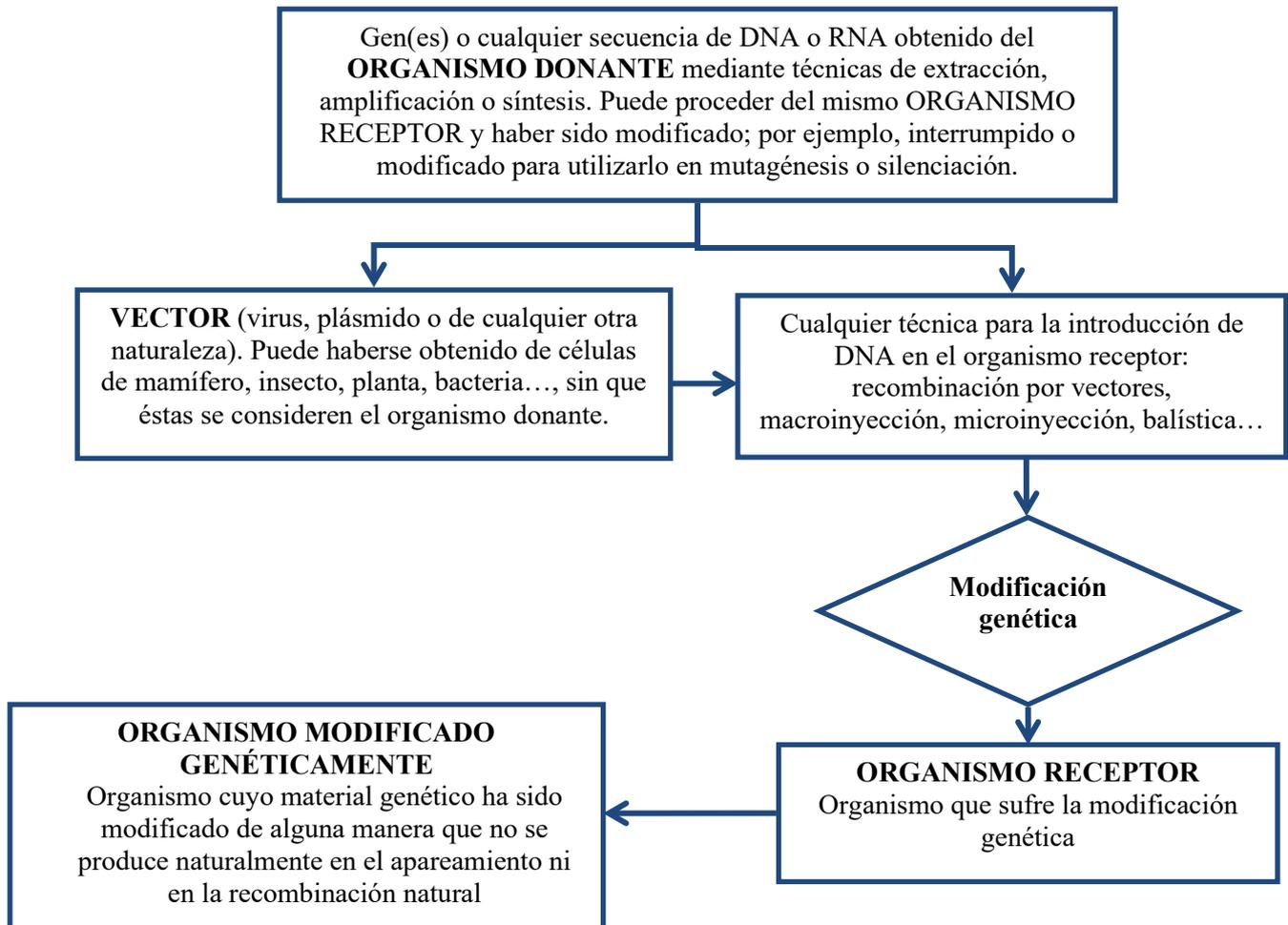
2) Clasificación de la actividad:

(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: *Brucella melitensis* y *Brucella microti*

Taxonomía: genero *Brucella* Familia Brucellaceae

Nombre común: *Brucella spp.*

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

Las cepas de *Brucella* se conservan liofilizadas en instalaciones de alta bioseguridad de la Universidad de Navarra (centro donde se obtienen los mutantes).

b) Técnicas de identificación:

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

Identificación molecular: PCR específica

c) Marcadores genéticos:

Presencia de la secuencia IS711 o secuencias específicas de especie

d) Marcadores fenotípicos:

Agglutinación con antisueros específicos

e) Estabilidad genética:

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

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Sin modificaciones genéticas previas

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI NO

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

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



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

Brucella está clasificada como patógeno tipo 3.

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

En humanos: fiebre, artromialgia, fibromialgia y otros síntomas no específicos.

En animales (principalmente rumiantes): aborto y esterilidad.

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

SI NO

Porqué: La bacteria no posee mecanismos de intercambio genético.

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

SI

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

Las personas que intervienen en el proyecto llevan trabajando con distintas especies del género *Brucella* desde hace décadas y están familiarizadas con todos los aspectos relativos a la bioseguridad del patógeno (han recibido numerosas resoluciones favorables del CIOMG).

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

- a) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?:
Brucella no se multiplica fuera de sus huéspedes o de las condiciones de cultivo. Sí es capaz de sobrevivir en el ambiente en determinadas condiciones, pero no de forma indefinida.

En caso afirmativo:

- b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

- | | | |
|----------------|----|--------------------------|
| i) esporas | NO | <input type="checkbox"/> |
| ii) endosporas | NO | <input type="checkbox"/> |
| iii) quistes | NO | <input type="checkbox"/> |



- iv) esclerocios NO
- v) esporas asexuales (hongos) NO
- vi) esporas sexuales (hongos) NO
- vii) otros, especifíquese

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

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

Posibles nichos ecológicos:

Ninguno fuera de los huéspedes animales naturales.

d) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

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

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

Ninguno.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Ninguno.

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

Brucella se encuentra en rumiantes (principalmente ovino, caprino y bovino), y es de distribución mundial.

12) Hábitat natural del organismo:

El interior de varios tipos de células (macrófagos, dendríticas, células epiteliales y otras) de sus huéspedes (ver 11).

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: *Brucella melitensis*

Taxonomía: Género *Brucella*. Familia *Brucellaceae*

Nombre común: *Brucella spp.*



2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

Distintos genes implicados en el metabolismo o la síntesis de elementos de la envoltura celular con una delección en la región central

3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in Vitro*

4) Función del gen/genes en el organismo donante:

Los genes están supuestamente implicados en el metabolismo o en la síntesis de la envoltura celular

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

SI NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i) seres humanos

ii) animales

iii) plantas

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

En humanos: fiebre, artromialgia, fibromialgia y otros síntomas no específicos.

En animales (rumiantes): aborto y esterilidad

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) Delección de material genético
- c) Sustitución de bases
- d) Fusión celular
- e) Otros, especifíquese

2) Finalidad de la modificación genética:

Obtener mutantes en genes implicados en funciones críticas para la virulencia, con el fin de obtener OMG de virulencia atenuada que puedan ser investigados como posibles vacunas

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

Se seguirá el mismo procedimiento para todas las construcciones

Los genes de interés mutados se clonarán en un vector suicida. Los plásmidos resultantes se introducirán en *Brucella* por conjugación. El plásmido es suicida y no puede replicarse en *Brucella*. Se producirá la recombinación homóloga entre el gen salvaje presente en el cromosoma y el gen mutado presente en el plásmido

El resultado final de este proceso es la sustitución, en el cromosoma de *Brucella*, de los genes de interés salvajes por los genes de interés mutados. Los organismos obtenidos tienen una mutación no polar y no llevan ningún marcador de resistencia a antibiótico adicional. Los plásmidos suicidas, al no poder replicarse en *Brucella*, se extinguen.



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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

Se utilizará un vector suicida que no puede replicarse en *Brucella* (pJQK)

b) Si se trata de un virus: No procede

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*):

La información sobre el vector pJQK se encuentra en Scupham and Triplett, 1997. *Gene* 1997 (202): 53-59. En el polisitio de clonaje (MCS) se clonará el gen de interés mutado.

d) Gama de hospedadores del vector:

Enterobacterias

e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

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

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

No procede.

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

Sí, pero únicamente en las condiciones de movilización descritas arriba.

4) Información del inserto:

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

Para la obtención de cada uno de los OMG el inserto contiene el gen de interés de *Brucella* con una delección en la región central

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

Puesto que el gen de interés que se modifica para obtener los distintos OMG tiene una delección interna, no es funcional.



c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Para la obtención de los distintos OMG el gen de interés mutado se clonará en un vector suicida. El plásmido resultante se introducirá en *Brucella* por conjugación. El plásmido es suicida y no puede replicarse en *Brucella*. Se producirá la recombinación homóloga entre el gen salvaje presente en el cromosoma y el gen mutado presente en el plásmido. El resultado final de este proceso es la sustitución, en el cromosoma de *Brucella*, del gen de interés salvaje por el gen de interés mutado. Los organismos obtenidos tienen una mutación no polar y no llevan ningún marcador de resistencia a antibiótico adicional. Los plásmidos suicidas, al no poder replicarse en *Brucella*, se extinguen.

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

Para la obtención de todos los OMG el inserto contiene el gen implicado en el metabolismo o en la síntesis de elementos de la envoltura e *Brucella* con una delección en la región central

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

Ninguno

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

SI

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

NO

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

NO

VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?

NO.

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?:

Los genes mutados en los distintos OMG están integrados en el cromosoma de la *Brucella*

En caso afirmativo:

i) número de copias: 1



ii) localización cromosómica: El gen mutado se localiza en la misma zona del cromosoma donde estaba el gen original al que ha sustituido

iii) secuencias colindantes: Las mismas que en el organismo original

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

La inserción inactiva únicamente el gen que se quiere mutar. Los mutantes construidos son NO polares y por lo tanto la expresión de otros genes NO se ve alterada.

c) Si se trata de un virus: **NO PROCEDE**

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*):

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

v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

vi) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto.

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

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

NO

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

Es esperable que la mutación de lugar a una atenuación de la virulencia. En todos los casos se estudiará cuando se obtenga el OMG.

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

Las OMG resultantes no se pueden multiplicar en el medio ambiente fuera de sus huéspedes naturales o de las condiciones de cultivo. Son desfavorables la exposición a la luz, el sol o la sequedad. Se estudiará cuando se obtengan los OMG

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

Se estudiará cuando se obtengan los OMG

f) Marcadores específicos del OMG:

Deleción en los genes modificados en cada construcción



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

Los OMG son estables indefinidamente

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

No existe

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

- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Los OMG se pueden diferenciar de la cepa parental mediante una reacción de PCR empleando dos oligonucleótidos que hibriden uno con la región situada antes del codon de iniciación del gen de interés y otro con la región situada inmediatamente después del codon “stop” de dicho gen. El tamaño del fragmento PCR obtenido será mayor en el caso de la cepa parental que en el caso del OMG

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

No se va a liberar al 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: 5 ml por experimento (10^9 ufc/ml)
- b) Número de plantas:
- c) Número de animales:

- 3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

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

2022-2024

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

La finalidad de esta actividad es desarrollar nuevas vacunas contra la brucelosis



- 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:

Universidad de Navarra (UNAV). Campus Universitario s/n, 31009 Pamplona (Navarra). Instalación autorizada para actividades con OMG de Tipo 3 (A/ES/18/I-22).

La construcción de estos mutantes ha sido recientemente notificada por UNAV con resolución favorable (A/ES/22/88).

- 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*):

El transporte de los OMG se realizará siguiendo las normas de seguridad correspondientes al género *Brucella*: Infectious substances in Category A. Packing instructions P620, label UN2814.

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

Los subcultivos del OMG se realizarán mediante repicado y extensión con asa de siembra en 2 ó 3 placas de Petri con medio sólido (BAB) e incubación en estufa (37°C) durante 24-48 h. Las suspensiones bacterianas para la preparación de inóculos vacunales tendrán un volumen total máximo de 5 ml (10^8 - 10^9 UFC/ml). Esta actividad tendrá lugar en el Laboratorio de Microbiología P3 del CITA.

Con algunos de estos OMG podrían realizarse ensayos de virulencia y protección en modelo murino para confirmar la atenuación de la virulencia del OMG con respecto a la cepa parental y evaluar su eficacia como vacuna frente una infección experimental. Para estos ensayos se inocularán grupos de 5 ratonas BalbC (animalario P3 del CITA) con dosis de entre 10^5 y 10^8 UFC/ml administradas en volúmenes de 0.1 ml.

Todas las actividades serán realizadas por personal cualificado, provisto de los EPI adecuados (guantes de nitrilo, mono o bata, gorro, delantal, manguitos y calzas desechables, gafas de protección y mascarilla).

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/>



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

Tanto los subcultivos como los inóculos del OMG se realizarán en el interior de cabinas de bioseguridad BIO-II-A (Telstar) situadas dentro del **Laboratorio de Microbiología** con nivel de contención 3 del CITA. Esta instalación ha sido autorizada para la manipulación de OMG hasta tipo 3 (A/ES/15/I-17).

Los ensayos en modelo murino serían realizados en el **Animalario** para ratones de experimentación del CITA (A/ES/17/I-30). Tanto la manipulación de los OMG como de los ratones de experimentación se realizarán en el interior de cabinas de bioseguridad (Topflow 3-Ehret- ; IBL-55 -Indelab).

El **Laboratorio de Microbiología** y el **Animalario** para ratones se ubican en el área con nivel de contención 3 del Edificio I+D del CITA y tienen acceso restringido (mediante carteles indicativos), se encuentran en depresión respecto a las zonas contiguas y disponen de filtros HEPA absolutos para filtrar el aire que sale al exterior. Los residuos biológicos son autoclavados *in situ* y posteriormente gestionados por empresa autorizada.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

No procede

- 2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Tanto el **Laboratorio de Microbiología P3** como el **Animalario** para ratones se mantienen a temperatura 22- 24 °C y presión negativa respecto al exterior, mediante un sistema automático de climatización que es revisado diariamente por el personal de mantenimiento.

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

La manipulación de estos OMG tendrá lugar en el **Laboratorio de Microbiología (A/ES/15/I-17)** y en el **Animalario** para ratones (A/ES/17/I-30) con NCB 3 del CITA.

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

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

La manipulación de los OMG (preparación de inóculos) se realiza dentro de cabinas de seguridad biológica en el **Laboratorio de Microbiología P3**.

La vacunación de los ratones con los inóculos de OMG, así como su posterior manipulación (necropsias) y se realizará dentro de cabinas de seguridad biológica en el **Animalario P3 (A/ES/17/I-30)**.

El acceso al **Laboratorio de Microbiología y al Animalario P3** se realiza a través del paso por diferentes puertas bloqueables con caída secuencial de la presión de modo que tanto el laboratorio



como el animalario quedan en depresión respecto a las zonas contiguas. A lo largo de dichas puertas bloqueables los investigadores y técnicos se cambian de ropa, desprendiéndose de su indumentaria habitual y vistiéndose con batas, calzas, gorro y guantes desechables. De igual modo, a la salida de las instalaciones, el personal se deshace de la ropa de trabajo y se viste con su indumentaria habitual. Esta instalación dispone de duchas, fuentes lavajos de descontaminación y botiquín de primeros auxilios. La desinfección de los residuos biológicos se realiza mediante autoclavado o baño con desinfectante bactericida testado (hipoclorito de sodio o DESSAN DAC ®). Tanto los residuos biológicos como el material fungible contaminado son introducidos en cubos herméticos proporcionados por la empresa gestora de residuos biológicos autorizada.

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Se dispone de protocolos y formularios para todos los procedimientos a realizar. Además, los responsables del laboratorio (Pilar M^a Muñoz) y del animalario (M^a Jesús de Miguel) se aseguran de que el personal implicado en las actividades recibe, lee y comprende los manuales de bioseguridad, el plan de emergencia y el plan de gestión de residuos.

2) Formación del personal adscrito:

Todo el personal ha recibido formación específica para el trabajo con patógenos de nivel 2 y 3 y está acreditado para el manejo de animales de experimentación (categorías a y b). Los investigadores responsables de la actividad (Pilar M^a Muñoz y M^a Jesús de Miguel) tienen amplia experiencia en la ejecución de proyectos de investigación con patógenos tipo 2 y 3 (particularmente con *Brucella*) y OMG (como demuestra su curriculum) y están acreditados para el uso de animales de experimentación (categorías a, b, c y f).

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Limpieza de las cabinas de seguridad biológica, tras su uso, con un desinfectante bactericida testado (DESSAN DAC ®) seguida de irradiación con UV. Para superficies también se utiliza este desinfectante. La salida de materiales y residuos se realiza a través de Autoclave o SAS. Existe la posibilidad de descontaminación ambiental por nebulización con formol-amoniaco de las salas y equipos utilizados.

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

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

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

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

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Inspecciones por la autoridad competente del Gobierno de Aragón.



El material contaminado es inactivado mediante el uso de autoclaves o baño con desinfectante bactericida testado (hipoclorito de sodio o DESSAN DAC ®).

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

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

4) Planes de emergencia:

Las instalaciones disponen de un Plan de Emergencias que los trabajadores reciben, leen y comprenden antes de iniciar su actividad en las instalaciones.

Ante accidentes derivados de la actividad se tomarán las siguientes medidas:

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

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

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

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

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

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

e) En el caso de accidente físico:

- Exposición ocular a aerosoles o salpicaduras:

Lavar al menos 15 minutos con agua.

Acudir al hospital para evaluación y tratamiento.

- Exposición a agujas o material punzante.



Lavar cuidadosamente la zona herida con agua corriente sin restregar

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

Desinfectar la herida con povidona yodada (u otro desinfectante)

Cubrir la herida con un apósito impermeable

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

En caso de producirse una infección por cualquiera de estos OMG, se tratará con rifampicina (15 días) combinada con doxiciclina (45 días).



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

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

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

- 2) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: Lucía Soriano Martínez
NIF: 02550317-P
Cargo: Directora Gerente
Tel: 976716891
Fax:
Correo electrónico: lsorianom@cita-aragon.es / lsorianom@aragon.es

- 3) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos: Pilar M^a Muñoz Álvaro
NIF: 08917172-A
Cargo: Investigadora
Tel: 976716460
Fax:
Correo electrónico: pmmunnoz@cita-aragon.es

- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
Nombre y apellidos: Lucía Soriano Martínez
NIF: 02550317-P
Cargo: Directora Gerente
Tel: 976716891
Fax:
Correo electrónico: lsorianom@cita-aragon.es / lsorianom@aragon.es

- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto
[Pilar M^a Muñoz Álvaro](#)



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).

Manipulación e inoculación en animales experimentales (ratón) de varios OMG de tipo 3 derivados de *Brucella* (descritos en el punto III del Parte A), cuya obtención se realiza en la Universidad de Navarra (en adelante, UNAV), tras su notificación a la CNB con resolución favorable (A/ES/22/88).

Las actividades concretas a realizar son:

(1) Preparación de inóculos (suspensión bacteriana de 1-5mL con concentración máxima de 10^{10} UFC/mL) de los OMG tipo 3 notificados.

(2) Inoculación intraperitoneal o subcutánea en ratones de experimentación con los inóculos mencionados en (1).

1) Objetivo de la actividad:

Obtención de vacunas vivas atenuadas frente a la brucelosis animal

2) Duración prevista de la actividad:

2022-2024

(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.

El organismo receptor es *Brucella spp* (*B. melitensis* o *B. microti*), bacterias intracelulares clasificadas como tipo 3, en las que se sustituirá un gen original por un gen mutado dando lugar al OMG. *Brucella* causa en humanos fiebre, artromialgia, fibromialgia y otros



síntomas no específicos y la infección se trata con antibioterapia. En animales (principalmente rumiantes) produce aborto y esterilidad. Las propiedades nocivas del OMG pueden ser inferiores en función del gen mutado.

b) Organismo donante.

El organismo donante es *Brucella spp* (*B. melitensis* o *B. microti*), clasificados como tipo 3 y sus propiedades nocivas son las mismas que las del organismo receptor.

c) Inserto.

Los genes presentes en el inserto tienen una delección interna y no son genes que codifiquen proteínas relacionadas con la patogenicidad; es decir, no son genes funcionales. Estos genes mutados reemplazan a los genes originales del organismo receptor y por lo tanto, se espera que las propiedades nocivas de los OMG resultantes sean inferiores.

d) Vector.

Vector suicida que no puede replicarse en *Brucella*

e) Organismo modificado genéticamente resultante.

Mutantes defectuosos en el metabolismo o en la síntesis de elementos de la envoltura celular

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

Los mismos que el organismo receptor. Se confirmará cuando se disponga del OMG

g) Efectos para el medio ambiente.

Ninguno

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 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 2 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 3 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Tipo 4 | <input type="checkbox"/> |



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).

Brucella se transmite principalmente por contacto directo de las mucosas con la bacteria o material contaminado con ella y puede transmitirse por aerosol en determinadas operaciones de riesgo, como el derrame de grandes volúmenes de solución bacteriana (no es el caso de esta actividad). 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 del CITA.

Tanto los subcultivos como los inóculos de los OMG se realizarán en el interior de cabinas de bioseguridad BIO-II-A (Telstar) situadas dentro del **Laboratorio de Microbiología** con nivel de contención 3 del CITA. Esta instalación ha sido autorizada para la manipulación de OMG de tipo 3 (A/ES/15/I-17).

Los ensayos en modelo murino serían realizados en el **Animalario** para ratones de experimentación del CITA, también autorizado para la manipulación de OMG de tipo 3 (A/ES/17/I-30). Tanto la manipulación de los OMG como de los ratones de experimentación se realizarán en el interior de cabinas de bioseguridad (Topflow 3- Ehret- ; IBL-55 -Indelab).

El **Laboratorio de Microbiología** y el **Animalario** para ratones se ubican en el área con nivel de contención 3 del Edificio I+D del CITA y tienen acceso restringido (mediante carteles indicativos), se encuentran en depresión respecto a las zonas contiguas y disponen de filtros HEPA absolutos para filtrar el aire que sale al exterior. Es obligatorio el cambio de ropa de trabajo al entrar y salir de estas instalaciones y el investigador o técnico utilizará los EPI requeridos (bata, calzas, gafas de seguridad, guantes de nitrilo y mascarilla P3) para realizar la actividad. Los residuos biológicos son autoclavados *in situ* y posteriormente gestionados por empresa autorizada.

Los investigadores y técnicos que realizan la actividad han recibido 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 de trabajo. Existen protocolos de trabajo conocidos por el personal que forma parte del proyecto, protocolos de bioseguridad específicos para el trabajo con *Brucella*, así como protocolo de actuación en caso de accidente.

- b) Concentración y escala utilizadas.

El proceso se realizará a escala experimental, por lo que la presencia de los OMG de estudio no será de magnitud elevada. La concentración máxima de bacteria a manipular será de 10^9 UFC/ml en un volumen máximo de 5 ml.

- 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 subcultivo, la preparación de inóculos vacunales y la manipulación de ratones (vacunación y necropsia) con este OMG se llevará a cabo en el interior de cabinas de seguridad biológica Bio-IIA (Telstar; Topflow 3-Ehret-; IBL-55-Indelab) que su vez se encuentran en salas con nivel de biocontención 3. Para el almacenamiento de los OMG se tomarán medidas de confinamiento



apropiadas usando recipientes herméticamente cerrados. Por todo ello, no es previsible que los cultivos de estos OMG produzcan efectos nocivos ni se liberen al entorno.

Se respetarán las medidas preventivas recomendadas para la manipulación de microorganismos potencialmente patógenos.

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

El grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana o animal y el medio ambiente. En el caso de *B. microti*, no se han comunicado infecciones en humanos, si bien no ha sido clasificada específicamente como *Brucella* no zoonótica debido a la escasa información publicada al respecto. Por ello, inicialmente, comunicamos esta actividad como tipo 3.

5) Determinación del riesgo en el caso de que se produzca una liberación accidental:

(Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto).

- a) Información adicional relativa a la ubicación de la instalación (proximidad a fuentes de peligro potenciales, condiciones climáticas predominantes, etc.)

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

Tanto el laboratorio de contención de nivel 3 (**Laboratorio de Microbiología**) en el que se cultivarán los OMG y se prepararán los inóculos vacunales, como el **Animalario** para ratones, están localizados en el Edificio I+D del campus del CITA (área suburbana). Estas salas disponen de sistemas automáticos de climatización (22-24°C), y están dotadas de sistema de presión negativa y eliminación de aire con control microbiológico mediante filtros HEPA del 99,9%.

Las posibilidades de una liberación accidental en las instalaciones descritas son mínimas debido a los equipos y sistemas de aislamiento empleados para la manipulación de los OMG y a los protocolos establecidos para la eliminación de los residuos, que son inactivados (por autoclavado o baño con desinfectante bactericida testado -hipoclorito de sodio o DESSAN DAC ®-) y posteriormente eliminados por la empresa gestora autorizada para el tratamiento de residuos biológicos.

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

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

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

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



- El cultivo de los OMG, la preparación de los inóculos vacunales y la manipulación de los ratones (vacunación y necropsia) se realizará en cabinas de bioseguridad biológica en el **Laboratorio de Microbiología y en el Animalario P3 del CITA**.
- Desinfección con autoclave o baño con desinfectante bactericida testado (hipoclorito de sodio o DESSAN DAC ®) de todo el material (sólido o líquido)
- Además, existe la posibilidad de descontaminar las salas por nebulización con equipo portátil de formol-amoniaco si se considerase necesario.
- Botiquín de primeros auxilios y fármacos
- El personal dispone de los EPI adecuados
- Extintores

d) Planes de emergencia.

El Plan de Actuación ante Emergencias de los laboratorios P3 se integra en el Plan de Autoprotección del Edificio I+D, del cual forman parte. Este edificio es de uso compartido entre el CITA y el Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Gobierno de Aragón. Los trabajadores reciben, leen y comprenden este plan antes de iniciar su actividad en las instalaciones. Además, en todas las puertas de la instalación P3 (laboratorio y animalario), está disponible un breve protocolo de actuación en caso de accidente, el listado de las personas responsables en caso de emergencia y los números telefónicos útiles en caso de emergencia.

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

En caso de rotura de viales o jeringas:

- Cubrir los derrames con exceso de desinfectante bactericida testado (hipoclorito de sodio o DESSAN DAC ®), dejar actuar durante 30 minutos antes de limpiar con papel absorbente y desechar los residuos en cubo con cierre hermético (proporcionado por la empresa autorizada para la gestión de residuos biológicos).

En el caso de accidente físico:

- Exposición ocular a aerosoles o salpicaduras:

Lavar al menos 15 minutos con agua.

Acudir al hospital para evaluación y tratamiento.

- Exposición a agujas o material punzante.

Lavar cuidadosamente la zona herida con agua corriente sin restregar

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



Desinfectar la herida con povidona yodada (u otro desinfectante)

Cubrir la herida con un apósito impermeable

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

Si bien el riesgo de infección con los OMG mencionados es bajo o nulo, en caso de producirse una infección alguno de ellos se tratará con rifampicina (15 días) combinada con doxiciclina (45 días).