



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

**I. INFORMACIÓN GENERAL**

**1. Responsables de la actividad**

**a. Entidad**

Nombre: GlaxoSmithkline Investigación y Desarrollo, S.L

Dirección postal: Calle Severo Ochoa, 2 Parque Tecnológico de Madrid 28760 Tres Cantos

**b. Representante legal de la entidad**

Nombre y apellidos:

NIF:

Cargo: Director GSK

Tel:

Correo electrónico:

**c. Responsable científico de la actividad**

Nombre y apellidos:

NIF:

Cargo: Investigator

Tel:

Correo electrónico:

**d. Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad**

Nombre y apellidos:

NIF:

Cargo: EHS&S Regional Lead Europe R&D

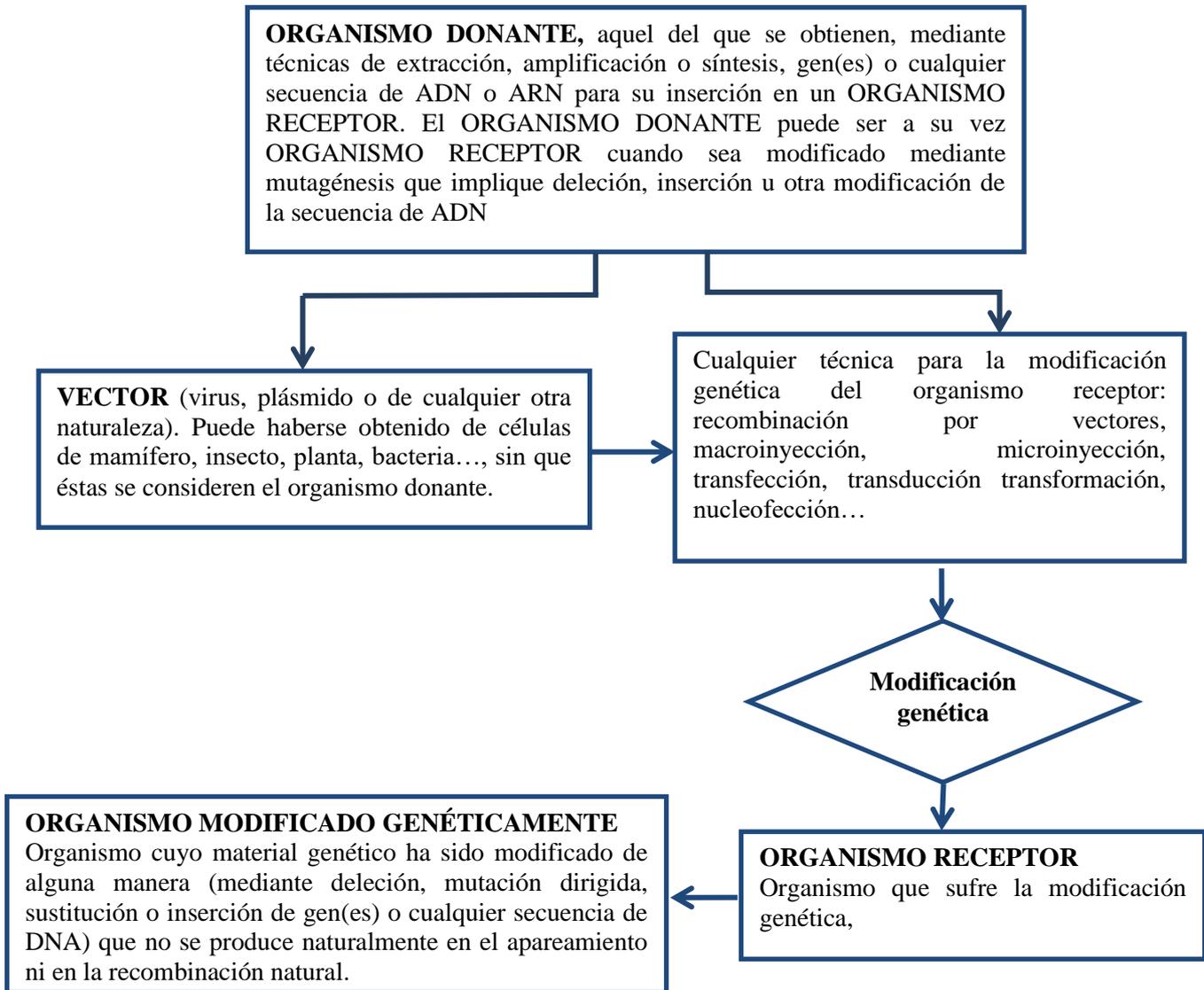
Tel:

Correo electrónico:

**e. Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto:**



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





## II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1. 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 especificando<sup>1</sup>:

- Nombre de la convocatoria:

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

- Organismo financiador:

Otro tipo de financiación<sup>2</sup>

2. Instalación donde se va a desarrollar la actividad (si la instalación no está autorizada, cumplimente el Formulario Parte B):

- Número de referencia de la notificación de la instalación (A/ES/./I-..):

A/ES/06/I-01

- Fecha de autorización de la instalación:

8 de Abril de 2006

Si el OMG no se genera en la instalación<sup>3</sup>:

- Nombre de la instalación de origen del OMG:

Rutgers University (Estados Unidos)

- Número de referencia de la notificación de la actividad en el caso de que se realice en España (A/ES/./../..)

<sup>1</sup>TASAS

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.

<sup>2</sup> Se deberá aportar la información que permita verificar esta circunstancia.

<sup>3</sup> Debe tenerse en cuenta que, si los OMG proceden de otra instalación española, ésta deberá haber cumplido con los requisitos establecidos en la legislación española de OMG. Si la actividad no dispone de número de notificación en el momento de presentar la solicitud, se deberá indicar el número de registro asignado a la misma.



- Número de referencia de la notificación de la instalación en el caso de que se ubique en España (A/ES/./I-..):

- Explicar cómo se realiza el transporte del OMG desde la instalación de origen teniendo en cuenta la legislación aplicable (especificar tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado)<sup>4</sup>:

El transporte de este OMG se realizará por una empresa autorizada para este tipo de transporte (BIOCAIR), además de cumplir con toda la normativa relacionada en cuanto a documentación, identificación y /o etiquetado. Este microorganismo proviene de Rutgers University (USA)

### 3. Finalidad de la actividad:

La finalidad de la modificación genética es la validación de nuevos fármacos antituberculosos en un OMG que contiene la expresión del gen de interés (glpK) silenciado, para posteriormente, realizar un estudio comparativo con la cepa Mtb H37Rv y la cepa anteriormente comunicada (A/ES/24/87), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv  $\Delta$ glpK::lux, que posibilite confirmar que la diana se ve comprometida por el efecto del fármaco.

### 4. 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 3

Tipo 4

## III. INFORMACIÓN RELATIVA A LA OBTENCIÓN DEL OMG (ver pie de página<sup>5</sup>)

### 1. Organismo receptor del cual deriva el OMG:

Células humanas/primates  Detallar las líneas celulares:

<sup>4</sup> 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](#). Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE núm. 268, 8.11.2007)
- 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/>
- [Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances](#) Edición bianual de la OMS

<sup>5</sup> No es necesario cumplimentar este apartado si el OMG procede de una instalación ya autorizada en España y el OMG ha sido también autorizado, o está en proceso de autorización en otra instalación. [Consultar la Guía práctica para la remisión de solicitudes de registro de instalaciones para llevar a cabo actividades de utilización confinada con organismos modificados genéticamente sobre el documento de acceso a la información que es obligatorio presentar.](#)



- Células: otras  Detallar las líneas celulares:
- Animal
- Planta
- Bacteria
- Hongo
- Virus
- Protozoos

-Especificar el nombre científico y común:

*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

**a.** Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i)** Técnicas de aislamiento: Cepas obtenidas de colecciones internacionales (ATCC).  
Subcultivo en medios de laboratorio
- ii)** Técnicas de identificación: Técnicas de biología molecular: PCR
- iii)** Marcadores genéticos: Todos los genes, ya que el genoma de H37Rv está secuenciado y son comprobables por PCR y/o secuenciación
- iv)** Marcadores fenotípicos: Velocidad de crecimiento y morfología
- v)** Estabilidad genética: Las tasas de mutación natural descritas son como las de cualquier organismo

**b.** La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

SI

- Especificar cómo se sabe que está libre de agentes biológicos contaminantes.

Sí, las cepas de colección se obtienen como cultivos bacterianos puros

NO

- Especificar si se conocen o se sospecha cuáles pueden ser.

**c.** Modificación genética anterior:

SI

- Describir:

- Cambios en virulencia, patogenicidad, tropismo, toxicidad, otros efectos.

NO



- d. Se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos intra/extracelulares (Asignar grupo de riesgo conforme al anexo II de Real Decreto 664/1997 tras evaluación del riesgo específica):

*M. tuberculosis* se considera Grupo 3

SI

Para:

Humanos	<input checked="" type="checkbox"/>
Animales	<input type="checkbox"/>
Plantas	<input type="checkbox"/>
Otros	<input type="checkbox"/>

- Posibles efectos alérgicos y/o tóxicos (describir):

*Mycobacterium tuberculosis* produce tuberculosis, una infección respiratoria, aunque también puede generar tuberculosis extrapulmonar, afectando a otros órganos, (meninges, riñones, ganglios linfáticos...) de manera menos frecuente

NO

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

SI  NO

- f. Experiencia previa adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor:

Existe una gran experiencia en la comunidad científica y médica internacionales en el estudio de *M. tuberculosis*, con publicaciones científicas describiendo trabajos realizados con este microorganismo.

- g. Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:

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

SI  Fuera de las condiciones de cultivo, *Mycobacterium tuberculosis* puede sobrevivir infectando a un ser humano, o durante varias semanas sobre superficies que no sean tratadas con la luz UV o del sol.

- Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

esporas	<input type="checkbox"/>
endosporas	<input type="checkbox"/>
quistes	<input type="checkbox"/>
esclerocios	<input type="checkbox"/>
esporas asexuales (hongos)	<input type="checkbox"/>
esporas sexuales (hongos)	<input type="checkbox"/>
otros, especifíquese:	



NO

**ii)** Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

No aplica

**iii)** Posibles nichos ecológicos:

Ser humano

**iv)** Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

**h.** Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

No aplica



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

No aplica

i. Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:

*M.tuberculosis* es universal

j. Hábitat natural del organismo:

Seres humanos

2. Organismo(s) donante(s). No completar el punto si no existiese organismo donante o si es el mismo que el organismo receptor.

- |           |                          |
|-----------|--------------------------|
| Humanos   | <input type="checkbox"/> |
| Animal    | <input type="checkbox"/> |
| Planta    | <input type="checkbox"/> |
| Bacteria  | <input type="checkbox"/> |
| Hongo     | <input type="checkbox"/> |
| Virus     | <input type="checkbox"/> |
| Protozoos | <input type="checkbox"/> |

-Especificar el nombre científico y común:

Mismo que organismo receptor

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI  NO

b. La cepa/línea celular donante: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

SI

– Especificar cómo se sabe que está libre de agentes biológicos contaminantes.

NO

– Especificar si se conocen o se sospecha cuáles pueden ser.

c. Modificación genética anterior:

SI

– Describir:



- Cambios en virulencia, patogenicidad, tropismo, toxicidad, otros efectos.

- d.** Se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos intra/extracelulares. (Asignar grupo de riesgo conforme al anexo II de Real Decreto 664/1997 tras evaluación del riesgo específica):

SI  Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros

- Posibles efectos alérgicos y/o tóxicos (describir):

NO

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

SI  NO

- f.** Tipo de material genético obtenido del organismo donante (gen codificante o fragmento del mismo, miRNA, lncRNA, etc.):

- g.** Método de obtención:

- Extracción

- PCR

- Síntesis *in vitro*

- h.** Función del gen/genes o secuencias en el organismo donante:

- 3.** ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?



#### IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA (ver pie de página<sup>6</sup>)

1. Objetivo de la modificación genética (sobreexpresión, silenciamiento, otros):

*M. tuberculosis* H37Rv  $\Delta$ glpK: eliminar la expresión del gen de interés, en este caso glpK, para la identificación de fármacos que actúen sobre esta diana en comparación con la cepa parental *M. tuberculosis* H37Rv y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv  $\Delta$ glpK::*lux*

2. Tipo de modificación genética:

- Inserción de material genético
- Deleción de material genético  Delecion del gen glpK de *M.tuberculosis* mediante el plásmido p2NIL-glpK-UpDN-pacl(+).
- Sustitución de bases
- Otros, especifique:

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

- Transformación
- Electroporación
- Macroinyección
- Microinyección
- Infección
- Transfección
- Fusión celular

Otros, especifique:

Para la generación del mutante *M. tuberculosis* H37Rv  $\Delta$ glpK se utiliza la técnica de reemplazo alélico (doi: 10.1073/pnas.1907631116)

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

SÍ  NO

En caso afirmativo:

a. Tipo e identidad del vector (plásmido, virus, otros):

**Plásmido para la delección del gen glpk:** p2NIL-glpK-UpDN-pacl(+).

<sup>6</sup> No es necesario cumplimentar este apartado si el OMG procede de una instalación ya autorizada en España y el OMG ha sido también autorizado, o está en proceso de autorización en otra instalación. [Consultar la Guía práctica para la remisión de solicitudes de registro de instalaciones para llevar a cabo actividades de utilización confinada con organismos modificados genéticamente sobre el documento de acceso a la información que es obligatorio presentar.](#)





**b. Gama de hospedadores del vector:**

Este plásmido alberga un origen de replicación de *E.coli* y se mantienen en una cepa huésped de *E.coli*

**c. Características de la movilidad del vector:**

**i) factores de movilización**

No posee

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

No aplica

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

No

**5. Información de la secuencia insertada, delecionada o modificada.**

**a. Función específica de cada parte de la secuencia insertada, delecionada o modificada:**

Gen eliminado: Glicerol kinasa (glpK). Este gen codifica la enzima glicerol-3-kinasa que interviene en el metabolismo del glicerol: El glicerol es fosforilado por GlpK a glicerol- 3-fosfato, que puedes ser usado para la generación de glicerofosfolípidos o para la síntesis de azúcares esenciales en *Mycobacteria* (doi: [10.1073/pnas.1907631116](https://doi.org/10.1073/pnas.1907631116))

La secuencia del gen glpK que se ha delecionado se encuentra a continuación en amarillo:

>Mycobacterium tuberculosis H37Rv | CDS | Rv3696c | 4138202-4139755 | - | glpK | downstream:0 | upstream:0

```
gtgtccgacgccatcctagggagagcaattggccgagtcctcggatttcatagccgccatcgaccagggcaccaccagcac
ccgctgcatgatcttcgatcaccacgggtgccgaggtggcccgccaccagctcgagcacgagcagatcctgccccgggccc
gctgggtggagcacaaccgggtcgagatctgggagcgcaccgcgtcggtggtgatctcgggtgctcaaccgccaaccta
tcgccgaaagatattgccgcttggggattaccaaccaactgagacgacgctggatggaatcggcacaccggagcggc
ctactacaacgcgattgtatggcaggataccgcaccgaccgcatcgctcggcgtggatcgagacggctcgtggaacc
tgatccgcccgaaggcgggcctgccgcccggcaacttatttctctggcggcaagctgcagtggatcctggaaaatgtcgt
ggagtccgcccggcgccgagaacggcgacgcaattgttcggcacaccggacactgggtggttggaaatctgacggcgg
gccgcccgggggggtgtgatgtcaccgatgtaaccaacgaccgacccatggtgatggatctagagacgctggagggg
acgacgagctggtgtcgttgttttcgatacctcgggcatcgtgccgagatcgatcgctcggcgcctcggagccttac
gggtcacgctggcgaccgggcctgtcggcgggtgaggtgccgatcaccggagtctcgggtgatcagcatgcccgatggt
cggcaagtctgtctggcccaggggagggcgaacacacctatggga
ccggcaattttctgtgctgaacaccgggtgaaacgatcgtgcgatcgaataacggcctgtaaccacgggtgtgctacaa
ttcgggaacgctaaaccgtgtacgcgcttgaaggttcgatcgcggtgaccggctcggcgggtgagtggttacgcatca
gctgggcatcatcagcggcgccgacagagtgaggcgtggcccggcagggtcccgacaacggcggcatgtatttcgtgc
cggcgttttcgggctgttcgcccatactggcgggtccgatgcgcccggcgcgatcgtcgggttgtcgggttcaacacc
aacgcgcacctggcgcgcaacgctggaggcgtatgctaccagagccgcgatggtggagcgcctatggaagcagactc
cgggtgttcgctgcaggtgttgaaggtggatggcgggatcacggcaacgacctgtgtatgcagatccaggccgacgtgt
tgggtgtggatgtggtcggccgggtggtcggcagaccaccgactaggtgtggcctacgcccgggcttggcgggtcggg
ttctgggcccgtccgtccgatctcgggccaactggcagaggacaagcgggtggacaccgacgtgggacgacgacgagcg
tgccgcccgggttatgccgctggcgaaggcgggtgcagcggaccctggattgggtgacgtgtcctag
```

Al eliminar la secuencia del gen glpK, se han mantenido los nucleótidos que codifican los codones de inicio (gtg) y de terminación (tag) y se ha reemplazado el marco abierto de lectura del gen glpK con un sitio de restricción “aagctt”. La secuencia del inserto es:

gtgaagcttttag



**b.** Información sobre los genes estructurales:

**c.** Información sobre los elementos reguladores:

**d.** ¿Ha sido secuenciada?

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

**f.** ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.

**6.** Si se ha utilizado un vector, ¿cuál es su situación final en el OMG?

**a.** Si el vector es un plásmido:

**i)** Se pierde  El plásmido p2NIL-glpK-UpDN-pacl(+) no se integra en el genoma, es un plásmido suicida. (doi:10.1099/00221287-146-8-1969)

**ii)** Se inserta en el genoma

- Aleatoriamente

- En un sitio definido

o Localización cromosómica:

o Secuencias colindantes:

o La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

**iii)** Se mantiene en forma episómica

- Número de copias:

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

**b.** Si el vector es un virus:



- i)** Se mantiene en forma episómica
- ii)** Se inserta en el genoma 
  - La inserción se produce al azar
  - La inserción es específica

- Localización cromosómica:

- Secuencias colindantes:

- La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

**iii)** Existe la posibilidad de formación de partículas víricas. Justificar:

**c.** Análisis moleculares previstos relativos a la expresión del producto deseado (*PCR, Southern, Northern, secuenciación, otros*):

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



V. **INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG) (ver pie de página<sup>7</sup>)**

1. Descripción del OMG final

El OMG *M.tuberculosis* H37Rv  $\Delta$ glpK presenta una delección del gen glpK

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 ser humano, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar:

No

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

No

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

No

- f. Marcadores específicos del OMG:

Los propios del vector de transformación

3. Información sobre la estabilidad genética previsible del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):

Los OMG serán genéticamente estables. Para su mantenimiento rutinario de *M. tuberculosis* se continúa con la presión de selección con Kanamicina.

4. Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos. Justificar:

Ninguna conocida

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

- a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Técnicas de biología molecular:PCR

<sup>7</sup> No es necesario cumplimentar este apartado, salvo el punto 1, si el OMG procede de una instalación ya autorizada en España y el OMG ha sido también autorizado, o está en proceso de autorización en otra instalación. [Consultar la Guía práctica para la remisión de solicitudes de registro de instalaciones para llevar a cabo actividades de utilización confinada con organismos modificados genéticamente sobre el documento de acceso a la información que es obligatorio presentar.](#)



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

No puede vivir libre en el medio ambiente ni tiene formas aislables del medio ambiente

## VI. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1. Descripción de la actividad. (Breve resumen de los ensayos que se prevén realizar, incluidos los que se llevarán a cabo con el OMG).

Búsqueda de nuevos fármacos antituberculosos. Se realizará un cribado en *M.tuberculosis* H37Rv  $\Delta$ glpK como ensayo secundario, y explorar posibles compuestos que sean interferentes con la tecnología Lux.

2. Información sobre el volumen o cantidad de OMG a utilizar:

- a. Volumen o concentración máxima por ensayo en el caso de microorganismos.

- i) Para preparación de lotes

200 ml

- ii) Para Inoculaciones. Método de inoculación *in vitro/ in vivo*:

200ml

- b. Número aproximado de plantas por ensayo:

No aplica

- c. Número aproximado de animales por ensayo:

No aplica

3. Naturaleza de las operaciones:

- a. Enseñanza
- b. Investigación
- c. Desarrollo

4. 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).

Indefinido



## VII. EVALUACIÓN DE RIESGO (ver pie de página<sup>8</sup>)

Se tendrán en cuenta los elementos y el procedimiento conforme al Anexo I del Real Decreto 178/2004 de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo).

1. Identificar cómo pudieran afectar las posibles propiedades nocivas del organismo receptor, donante, inserto y vector al OMG que se va a generar:

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

- a. Organismo receptor.

*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

M. tuberculosis está clasificado dentro del nivel de bioseguridad 3 (que puede causar una enfermedad grave en el hombre y presenta un serio peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propague a la colectividad, existiendo un tratamiento eficaz). M. tuberculosis es capaz de causar una infección aguda en el hombre. Existen tratamientos eficaces que erradican el patógeno.

No se le conoce participación en procesos ambientales. Ni se conocen plásmidos ni virus endógenos capaces de movilizar el ADN introducido a otras especies o microorganismos. No tienen fases de vida libre ni forman estructuras resistentes de supervivencia en el medio

- b. Organismo donante.

- c. Inserto.

Tanto el ADN introducido como los marcadores genéticos que permiten identificar clones en los que la modificación genética ha funcionado han sido ampliamente utilizados y descritos en la literatura. El marcador de resistencia a Kanamicina no hace al organismo resistente a los antituberculosos utilizados en el tratamiento de primera línea frente a tuberculosis

- d. Vector.

Vector caracterizado de *E.coli* portando los marcadores y un origen de replicación de micobacterias ampliamente utilizado y bien caracterizado

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG<sup>9</sup>

- a. Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

Como el organismo sin modificar. El plásmido presenta un cassette de resistencia a la Kanamicina

Ninguno de los marcadores descritos en el apartado anterior hace al organismo resistente a los antituberculosos utilizados en el tratamiento de primera línea frente a tuberculosis.

<sup>8</sup> No es necesario cumplimentar este apartado, salvo los puntos 2, 3 y 4, si el OMG procede de una instalación ya autorizada en España y el OMG ha sido también autorizado, o está en proceso de autorización en otra instalación. [Consultar la Guía práctica para la remisión de solicitudes de registro de instalaciones para llevar a cabo actividades de utilización confinada con organismos modificados genéticamente sobre el documento de acceso a la información que es obligatorio presentar.](#)

<sup>9</sup> Si se considera que no tienen efectos adversos para la salud y el medio ambiente, también hay que justificarlo.



b. Efectos para el medio ambiente.

Ninguno previsible

3. Descripción de las fases críticas de los ensayos en cuanto a bioseguridad:

Los experimentos de transformación genética con *M. tuberculosis* se llevarán a cabo conforme a las directrices del Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, aplicables a organismos clasificados en el nivel de bioseguridad 3, así como las del Real Decreto 178/2004, de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por el que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente. El trabajo se hará en laboratorios dedicados, claramente marcados, con control individual de accesos y situados dentro de un Departamento al que a su vez sólo acceden personas autorizadas. Los laboratorios cumplen además todos los requisitos de contención de nivel 3 como mínimo. El organismo se mantendrá en cultivo (volumen típico 10 ml) en botellas cerradas dentro de un incubador cerrado mientras dure el análisis genético y fenotípico de la modificación introducida. Las manipulaciones experimentales se realizarán dentro de una cabina de bioseguridad de tipo 1, 3 o en aisladores. Concluido el análisis se congelarán alícuotas de 1 ml a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se esterilizará el resto del cultivo. Las muestras congeladas se guardan en arcones cerrados con llave, custodiada por personas autorizadas por el Responsable del Departamento.

La exposición humana se minimizará prohibiendo tener el microorganismo no encapsulado fuera de la cabina de seguridad. Por encapsulado se refiere a que se disponen de medidas tanto de ingeniería (aisladores, cabinas de bioseguridad clase 1 y 3, presiones negativas respecto a las áreas adyacentes al laboratorio NCB3, como control de acceso personalizado a las áreas bioprotegidas con los correspondientes equipos de protección individual (EPIs). En el caso concreto de las cabinas tipo I, estas están situadas dentro del laboratorio NCB3, que además cuenta con una velocidad de renovación de aire superior a la de un laboratorio convencional (41 renovaciones por hora en NCB3 frente a 6 renovaciones por hora en un laboratorio NCB2). Además, el microorganismo siempre será transportado y mantenido con doble contención física. Se dispondrá del material necesario para el transporte de un lugar del laboratorio a otro (Ej. de la cabina al incubador) y para el almacenamiento del microorganismo (en incubadores, neveras) minimizándose así el riesgo de la caída y rotura de cualquier material. Se evitará el uso de material de vidrio.

La liberación accidental al medio ambiente se evitará trabajando con un nivel de contención tipo 3 y autoclavando todos los residuos biológicos antes de sacarlos al exterior de la zona bioprotegida, igual que para la notificación A/ES/03/I-01. Todos los residuos, una vez esterilizados, son retirados por empresas especializadas autorizadas: CONSENUR, S.A. para los sólidos (autorización nº AAI/MD/G11/08043) y GESTIÓN Y VALORIZACIÓN DEL CENTRO, S.L. para los líquidos (autorización nº AAI/MD/G11/10134), para ser eliminados según la legislación medioambiental vigente.

4. Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse en las diferentes fases:

El organismo vivo se manipulará conforme a las directrices del Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, aplicables a organismos clasificados en el nivel de bioseguridad 3; así como las del Real Decreto 178/2004, de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por el que se



establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente.. El trabajo se hará en laboratorios dedicados exclusivamente a estos microorganismos, claramente marcados, con control de accesos y situados dentro de un Departamento al que sólo acceden personas autorizadas. Los laboratorios cumplen todos los requisitos de contención biológica de nivel 3.

Los residuos se sacan del laboratorio, pero siempre dentro de la zona bioprotegida, en doble bolsa autoclavables cerradas dentro de contenedores metálicos cerrados para autoclave. Tras el autoclavado, usando ciclos regularmente validados, los residuos estériles se sacan de la zona bioprotegida y serán retirados por empresas especializadas autorizadas (CONSENUM para los sólidos y GVC para los líquidos).



## VIII. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA<sup>10</sup>

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

Los investigadores y el personal auxiliar utilizan batas de laboratorio distintas a las usadas en el resto del edificio y que sólo salen de los laboratorios en bolsas cerradas para ser autoclavadas. Los procedimientos normalizados de trabajo (PNTs), de obligado cumplimiento, especifican entre otras normas, el uso de guantes de laboratorio y mascarilla FFP3, la prohibición de introducir en el laboratorio objetos punzantes o cortantes salvo en ocasiones puntuales, cuando sea imprescindible para la realización de la actividad y bajo autorización y supervisión del jefe de laboratorio, y la obligación de abrir y manipular contenedores con microorganismo vivo solamente dentro de las cabinas de bioseguridad o aisladores. Las superficies de la cabina y todos los materiales y aparatos se desinfectan Teknon™ Biocleanse antes y después de cada uso.

Se adjuntan los procedimientos de trabajo (SOPs/PNTs):

VQD-SOP-005460 Limpieza, Desinfección y Esterilización en zonas de Nivel de Contención Biológica 3 y 3\*

VQD-SOP-004763 SOP 005380: Trabajo con *Mycobacterium tuberculosis*

### 2. Formación del personal adscrito:

Todo el personal adscrito cuenta con la formación académica requerida para el puesto de trabajo, más el entrenamiento específico proporcionado, así como los cursos de formación a los que se refiere el artículo 12 del Real Decreto 664/1997, y la formación continua obtenida con la asistencia a cursos y congresos según lo apropiado a su nivel profesional. El supervisor tiene más de 15 años de experiencia en el trabajo experimental con *Mycobacterium tuberculosis* y ha trabajado en varios centros de reconocido prestigio en el estudio de este microorganismo. Los trabajadores cuentan con la siguiente información y formación en Prevención de riesgos laborales.

- Ficha de riesgos del trabajador
- Ficha de actuación en caso de emergencia
- Información y formación inicial sobre los riesgos y medidas preventivas en los puestos y áreas de trabajo. Información y formación en bioseguridad para trabajar en áreas de NCB3.
- Formación específica en técnicas de laboratorio.

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

Las superficies de trabajo se descontaminarán con Teknon™ Biocleanse antes y después de cada uso. Existen planes normalizados de trabajo para actuaciones en caso de accidente o derrames. Todos los laboratorios y cabinas de seguridad están acondicionadas para poder realizar una desinfección con peróxido de hidrógeno (VHP). La desinfección con VHP se realizará periódicamente como medida de prevención.

<sup>10</sup> En el caso de que la actividad se realice en una instalación ya autorizada, se deberán describir las medidas de protección adicionales a las descritas en el formulario B que se presentó en la solicitud para la autorización de la instalación, teniendo en cuenta el riesgo específico de la actividad.



La limpieza rutinaria de suelos se realizará por el mismo personal que trabaja en el laboratorio y se realizará con Teknon™ Biocleanse. Todo el material y los desechos se descontaminarán (VHP o autoclave) antes de sacarlos del área de contención.

4. Programas de mantenimiento de los sistemas de confinamiento y protección:

No son necesarios aparatos dedicados exclusivamente para el confinamiento. El organismo se manejará siempre en cabinas de bioseguridad de tipo 1 o 3 y aisladores, que están incluidos en un plan de mantenimiento preventivo regular realizado por la empresa TDI (Tecnología para Diagnóstico e Investigación). Se adjuntan las fichas de los diferentes equipos (cabinas de bioseguridad, Filtros absolutos, Autoclaves, cajas de mezcla y reguladores de caudal, Climatizadores y termoventiladores, Ventiladores y extractores, Sistemas de detección de gases explosivos, Esterilizadores peróxido de hidrógeno, baterías de recalentamiento y Transmisores de presión) donde se especifican todas las previsiones para su mantenimiento preventivo.

5. Programas de verificación y validación de los sistemas de confinamiento y protección:

Todos los sistemas de contención del laboratorio están incluidos en un plan de mantenimiento preventivo regular realizado por TDI con la periodicidad indicada en las fichas adjuntas. Periódicamente se realizará una desinfección con VHP del laboratorio, cabinas de seguridad y aparatos como medida preventiva. Adicionalmente, se realizan inspecciones periódicas mensuales por los recursos preventivos junto con los técnicos del Servicio de Prevención Propio.

## IX. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1. Encargado de la gestión de residuos:

a. Gestión interna: SÍ  NO

- Método de inactivación, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados:

Todos los residuos serán esterilizados en autoclave (con ciclos validados para sólidos y líquidos y con controles químicos y biológicos) antes de sacarlos de la zona bioprottegida. Los residuos una vez estériles serán retirados según el punto anterior.

b. Gestión por una empresa externa: SÍ  NO

- Nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:

Los residuos son gestionados por empresas externas una vez inactivados:

Sólidos: CONSENUR, S.A. (AAI/MD/G11/08043)

Líquidos: GESTIÓN Y VALORIZACIÓN DEL CENTRO, S.L.(AAI/MD/G11/10134)

- Existen procedimientos sobre gestión de residuos:

o Inactivación de residuos biológicos contaminados para líquidos.

o Autoclave para sólidos y sólidos + líquidos.

La gestión de residuos se realiza con gestores autorizados.

## X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA



**1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:**

Todo el trabajo con microorganismos vivos se realizará en cabinas de bioseguridad de tipo 1 o 3. El peligro de un accidente es la exposición del trabajador a aerosoles creados conteniendo el microorganismo. Fuera de la cabina de seguridad se podría producir un accidente al centrifugar las muestras (por ello se utilizarán centrífugas de seguridad con tapas herméticas para cada rotor) o que se cayera un recipiente con cultivos de micobacterias (para hacer los cultivos se utilizará siempre material de plástico y se utilizarán soportes de botellas o similares).

**2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):**

Existe un gradiente de presión desde el exterior al laboratorio. Seguridad personal: batas, dobles guantes y mascarilla FFP3. Cabinas de bioseguridad de tipo I-III. Centrífugas con cierre de seguridad y rotores que se cierran herméticamente. Recipientes y mesas auxiliares para minimizar el riesgo de que se produzca la caída y rotura de recipientes que contengan micobacterias. Se evitará la utilización de material de cristal. Se usarán sistemas de respiración autónoma en el caso de un derrame. Todos los laboratorios y las cabinas de seguridad están preparadas para poder realizar una desinfección completa con peróxido de hidrogeno.

**3. Descripción de la información y formación suministrada a los trabajadores:**

Todo el personal adscrito cuenta con la formación académica requerida para el puesto de trabajo, más el entrenamiento específico proporcionado por su supervisor, más los cursos de formación a los que se refiere el artículo 12 del Real Decreto 664/1997, y la formación continua obtenida con la asistencia a cursos y congresos según lo apropiado a su nivel profesional. La supervisora tiene gran experiencia en el trabajo experimental con *Mycobacterium tuberculosis*, ha trabajado en varios centros de reconocido prestigio en el estudio de este microorganismo.

**4. Planes de emergencia y contingencia:**

Se adjunta plan de Autoprotección