

RESEÑA ANALITICA

Bioseguridad y microorganismos modificados genéticamente

Lázaro Regalado Alfonso, Martha J. Alfonso González y Nibaldo L. González Sosa.

Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, Apartado Postal 23031, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 21 de febrero de 1998. Aceptado: 24 de diciembre de 1999.

Palabras clave: bioseguridad, microorganismos modificados genéticamente, gestión de riesgo, contención y mitigación.
Key words: biosafety, genetically modified microorganisms, risk assessment, contention and mitigation.

RESUMEN. Se presentan los principios básicos de la Bioseguridad en relación con la manipulación de microorganismos modificados genéticamente (MMG) haciendo énfasis en los riesgos para el medio ambiente, así como la manera de abordarlos y tratarlos. Esta reseña abarca diferentes tipos de microorganismos de importancia para la agricultura y el hombre, a este último, relacionados directa o indirectamente. La evaluación caso por caso y paso por paso, es la piedra angular del enfrentamiento de estos riesgos que no pueden ser ignorados aun cuando en el laboratorio y en liberaciones controladas no se muestren reacciones adversas. El riesgo al manipular y utilizar los MMG existe, como también los mecanismos para evaluarlos, evitarlos o reducirlos. Consideraciones similares de valoración de riesgo, evaluación, contención física, biológica y mitigación, se tienen con otros microorganismos no modificados genéticamente, igualmente aplicables a los MMG en el cuidado y preservación del medio ambiente. El rápido y creciente desarrollo de la industria biotecnológica en Cuba, la investigación, el desarrollo y el potencial uso de esos agentes biológicos, justifican el tratamiento cada vez más profundo de estos temas actuales. El trabajo está dirigido a los investigadores y directivos que en cualquier lugar y a cada momento tienen que tomar decisiones, y tiene el propósito de mantener la alerta sobre las implicaciones o consecuencias que pueden traer las modificaciones genéticas de los microorganismos al ponerse en contacto con los diferentes elementos del medio ambiente si no se aplican los principios de la bioseguridad, teniendo en cuenta que las decisiones de hoy son la tranquilidad del mañana.

ABSTRACT. Basic biosafety principles are presented in connection with the manipulation of genetically modified microorganisms (GMM), emphasizing in environmental risks, their assessment and treatment. This review is about different kinds of microorganisms concerning agriculture and human health with direct or indirect relationship. A case-by-case approach and step-by-step evaluation is the keystone to face these risks that can't be minimized even when at the laboratory level and controlled releases, adverse reactions are not seen. The risks in the manipulation and use of GMM exist as well as the mechanism to evaluate, avoid or reduce them. Similar considerations about risk assessment, evaluation, physical and biological contention and mitigation are taken into account with other non-genetically modified microorganisms that is, many of those working tools in care and preservation of the environment are used as well. The fast and growing development of the Cuban biotechnology industry, the research-development and potential use of biological agents above mentioned, justify a deep and also growing follow-up of these current issues. This article is dedicated to researchers and managers who have to make decisions at all levels and to keep them alert about the consequences or implications that can be brought about with these modifications and the use of such a kind of microorganisms taking into account those biosafety principles. Current decisions are the future safety and welfare.

INTRODUCCION

La bioseguridad, disciplina que aparece como respuesta al creciente número de infecciones adquiridas en el laboratorio y a los riesgos en la manipulación cada vez mayor de los microorganismos y dentro de ellos los patógenos conocidos y potenciales, tiene su campo de aplicación más reciente también en los microorganismos modificados genéticamente (MMG).

Si se define bioseguridad como el conjunto de medidas técnico-ingenieras y científico-organizativas encaminadas a proteger por una parte al trabajador del laboratorio que está en contacto directo o indirectamente con los microorganismos y por otra al medio ambiente y la comunidad, a ninguna de estas categorías de protección escapan los riesgos que se enfrentan con los MMG. El trabajo está dirigido a los investigadores y directivos que toman decisiones, con el propósito de mantener la alerta sobre las implicaciones o consecuencias que pueden traer las modificaciones genéticas de los microorganismos (mo) al ponerse en contacto con los diferentes elementos del medio ambiente si no se aplican los principios de la bioseguridad, teniendo en cuenta que las decisiones de hoy son la tranquilidad del mañana.

MICROORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

Un microorganismo modificado genéticamente es aquel cuya estructura genética original ha sido alterada artificialmente por técnicas de biología molecular y su genoma que

ahora cuenta con un segmento de ADN foráneo, es muy poco probable encontrarlo en la naturaleza.

El objetivo de esta modificación se dirigirá a mejorar características existentes del mo o a introducirle nuevas funciones. Esto ocurre al aislar genes y transferirlos en su estado funcional al mo que se va a modificar mediante un vector apropiado.^{1,3}

Quiere decir que se debe tener:

- Los genes aislados (que codifican para producir una proteína, una toxina, una hormona).
- Un vector (plasmidos, virus) en los que se inserta el gen aislado. Este vector se introduce en una célula bacteriana a la que pasa su información genética integrándose a su genoma, la bacteria entonces expresa el gen, obteniéndose el producto o el efecto deseado.
- Un hospedero (la bacteria a modificar, descrita anteriormente).

La relación de los tres elementos antes vistos apoyados por la manipulación del hombre traen consigo la obtención de los microorganismos transgénicos a partir de los existentes, pero con nuevas características o las existentes mejoradas cuyo genoma no se encuentra en la naturaleza pero que pudiera llegar a ella y establecerse, incluso en otras especies y géneros, constituyendo en este caso, un riesgo ecológico que puede actuar directa o indirectamente en la salud humana, animal o de las plantas.^{1,2,4}

PERSISTENCIA Y SUPERVIVENCIA DE LOS MMG

En la mayoría de los casos, los MMG tienen desventajas con el resto para su supervivencia y competencia debido a la carga metabólica asociada con el hecho de portar y expresar funciones adicionales (material genético foráneo introducido).¹ No obstante, algunas manipulaciones pueden traer consigo el aumento de la capacidad de sobrevivencia y persistencia en competencia con otros organismos, así ocurre al introducir la capacidad para aumentar el metabolismo de un substrato o para aumentar la tolerancia a factores físicos como el frío o la resistencia a antibióticos.

Los factores del medio ambiente que pueden afectar la persistencia, estabilidad y expresión de los MMG, incluyen:

- El tipo de suelo.
- La disponibilidad de nutrientos y humedad.
- El pH y la temperatura.

- Los inhibidores químicos.
- Los aspectos biológicos (competencia, depredadores, etc.).

Las comunidades de microorganismos establecidas resisten la colonización de otros en su nicho ecológico.

Varios factores adicionales pueden favorecer la supervivencia y dispersión de los MMG^{1,9,10} tales como:

Los vectores mecánicos (insectos, animales).

Las corrientes de aire y las lluvias.

Estos factores y otros potenciales, hacen difícil controlar la dispersión en situación de campo (liberación deliberada) e incluso en liberaciones controladas deben tenerse en cuenta.^{1,2}

Las etapas finales de las evaluaciones de riesgo y la consiguiente gestión del riesgo tendrán en cuenta, en conjunto, todos estos elementos para la toma de decisiones de las autoridades competentes en la autorización de las liberaciones y aplicación de los MMG.

Las consecuencias de los posibles escapes o dispersiones no pueden ser calculadas con todo rigor y pueden ser no discernibles, de poca importancia o causar daños severos en el equilibrio ecológico. El hombre puede estar amenazado también de forma directa y la modificación genética al microorganismo o a sus productos pueden afectar la salud y la seguridad de la comunidad. En el proceso de investigación y otras etapas, en la manipulación propiamente dicha, pueden existir riesgos potenciales, así como en las aplicaciones en grandes volúmenes donde puedan actuar indirectamente como alérgenos o directamente causando enfermedades.^{1,4,5,10,11}

La supervivencia y persistencia se logra fundamentalmente con nuevas capacidades introducidas que le permiten al MMG la competencia ventajosa con el resto.¹

En el caso que un MMG sea patógeno al hombre o los animales pueden desencadenarse epidemias que le garanticen su persistencia. Hasta hoy, la utilidad de estos se encuentra en el campo de la agricultura como biofertilizantes y bioplaguicidas y en otros campos como la alimentación y la salud humanas.^{1,3,4}

Por otra parte, mecanismos genéticos naturales que intervienen en la transferencia de genes en la bacteria pueden contribuir a la supervivencia y persistencia de los MMG en el ambiente.^{1,3} Estos mecanismos

son: la conjugación, la transducción y la transformación.

Hay evidencias de que la transferencia genética por conjugación puede ocurrir en el suelo a pesar de todas las barreras fisiológicas y del medio ambiente. Existe además potencial para la ocurrencia de transformación y la transducción ocurre en un número significativo de bacterias y bacteriófagos en el medio ambiente de manera que puede existir el intercambio genético entre especies o géneros, siendo muy difícil evaluar su significación.¹

La resistencia a antibióticos se ha utilizado ampliamente como marcador de algunos MMG junto a otros insertos, en este caso, durante su presencia en el medio ambiente pudiera ocurrir una transferencia de resistencia antibiótica a otros patógenos, lo cual incrementaría su patogenicidad. Procesos similares han ocurrido de forma natural en la luz intestinal entre enterobacterias y en medios acuáticos entre bacterias de la especie *V. cholerae* y que ha ayudado a la persistencia de una característica indeseable.

La mayor importancia de los MMG radica en sus virtudes y utilidades que se expresan en la agricultura, la industria alimentaria y farmacéutica, la obtención de medios de diagnóstico y otras (Tabla 1).^{1,3,10,11}

Por otra parte, la modificación genética de un agente biológico con fines hostiles para su utilización como arma biológica, es repudiado y prohibido por tratados internacionales y no deja de seguir siendo preocupación en círculos científicos y gubernamentales.^{12,17}

Entre los agentes biológicos con características deseables están los bioplaguicidas, los cuales tienen la función de control de las plagas por los mecanismos antes vistos. Muchos se han seleccionado o tratado genéticamente para lograr su persistencia en la naturaleza, pudiéndose aplicar en grandes volúmenes y amplias regiones. Esto implica no obstante, que pueden transmitir esa información genética a otras especies y géneros haciéndose difícil evaluar el comportamiento de éstos, constituyendo un riesgo ecológico. Existen cuatro elementos fundamentales para valorar los posibles riesgos del estudio y liberación de los biopesticidas en general y los MMG en particular:

Análisis general

- Objetivos que se persiguen.
- Beneficios y costos.

- Riesgos.
- Factibilidad.
- Existencia de infraestructura de instalaciones y recursos humanos.
- Justificación.

Características del microorganismo donante y del receptor

- a) Caracterización del mo donante y del receptor (ubicación taxonómica, caracterización bioquímica e inmunológica, genética e inocuidad).
- b) Resistencia a condiciones ambientales adversas, a desinfectantes, antibióticos y otros factores.
- c) Intercambio genético (ocurrencia de transducción, conjugación o transformación en el laboratorio o en el medio ambiente).

Información para la inserción del material genético

- Tipo de material, fuente y funciones.
- ¿Cómo se obtuvo el material? ¿Cómo se identificó y aisló? ¿Cómo se pretende insertar?
- Identificación del vector y del sitio de inserción.
- Ubicación, cantidad y estabilidad del gen insertado.
- Cualquier dato que ofrezca información acerca de sobrevivencia, persistencia, multiplicación y diseminación.

Possible repercusión en el medio ambiente

Información sobre todos los componentes:

- Del organismo.
- Del ensayo.
- De las medidas de seguimiento, identificación y de mitigación.

Los elementos I y II son en su fundamento válidos para otros mo en la valoración y gestión riesgo.

En general, puede decirse como regla que si ninguno de los compo-

nentes de la manipulación genética presenta riesgos conocidos y ninguno puede predecirse de la combinación, entonces no se necesitan restricciones para el posible riesgo biológico más allá de las necesarias para los componentes de la manipulación.^{1,18}

La mayoría de las investigaciones con ADN recombinante solamente tienen una posibilidad remota de crear un riesgo (en el laboratorio y en liberaciones controladas) debido a que, el ADN transferido, el vector y el hospedero son todos inocuos.¹ Es decir, si el mo receptor propiamente dicho es del grupo riesgo I ó II, se aplicarán en el trabajo niveles de bioseguridad (NBS) 1 ó 2; si el mo es de grupos superiores, lo cual es muy poco probable, entonces se aplicará contención física y principios operacionales de esos niveles (NBS 3 ó 4). Es menester tener en cuenta, además, si el gen donado es capaz de expresar un factor de virulencia en el receptor, como pudiera ser una toxina, entonces se tendrá en cuenta ese riesgo, ubicándolo en el grupo correspondiente del mo que produce la toxina.

Existen diferentes clasificaciones de los mo en grupos de riesgo, así como de los tipos de laboratorio, el denominador común es clasificar en orden creciente o decreciente el peligro que representan éstos para el personal que los manipula por una parte y el riesgo que representan para la comunidad o el medio ambiente (o para ambos) por otra y en consecuencia ubicarlos en una instalación o laboratorio cuyas condiciones de contención física y de prácticas de seguridad sean apropiadas para el riesgo que se enfrenta. Un mo ubicado en un grupo de riesgo II se trabaja en un NBS II o Laboratorio Básico, otro del Grupo de Riesgo III,

o grandes volúmenes de algunos del Grupo II se trabajan en un NBS 3 o BL3.^{1,18,20}

Es importante tener en cuenta que la valoración del riesgo comienza con la propia concepción del proyecto de modificar a un mo genéticamente y después en diferentes etapas hasta traspasar las fronteras del laboratorio propiamente dicho, en las liberaciones controladas primero y después en sus aplicaciones de campo a pequeña y gran escala; en todo este proceso se cuenta con técnicas de seguimiento que deben ser seleccionadas cuidadosamente y que constituyen una poderosa arma en esas etapas y para orientarse en la gestión de riesgos, es decir, en las medidas que se deban adoptar.¹

En las etapas de investigación, desarrollo e investigación controlada se va aumentando la familiaridad con los MMG y se van logrando las técnicas específicas que más adelante asistirán en el seguimiento alrededor del sitio de liberación.

El seguimiento persigue obtener información sobre la efectividad diseñada del MMG, sobrevivencia y dispersión, la estabilidad genética y cualquier efecto biológico no deseado o expansión inesperada de otros.

Las técnicas para este seguimiento comprenden entre otras:

- Detección y conteo de los MMG en el ambiente.
- Técnicas con anticuerpos fluorescentes.
- Métodos para detectar genes de resistencia antibiótica, tolerancia a metales pesados, bioluminiscencia y pigmentación.
- Sondas para hibridación ADN o ARN que son muy sensibles y específicas.
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que puede detectar cantidades ínfimas de material genético.

El temor inicial con estos mo se ha ido modificando sobre la base de la familiaridad y experiencia en su manipulación,¹⁰ lo cual no implica que se dejen de tomar las medidas necesarias y se evalúe caso por caso. La política de regulaciones en la seguridad de la biotecnología en general y en particular con este tipo de mo, es la piedra angular del éxito de su obtención y utilización segura; para llegar ahí, es importante tener en cuenta todos estos elementos.^{1,5,9,11}

No obstante todas estas medidas y técnicas de seguimiento, es obvio que la posibilidad del riesgo, de accidentes, de imprevistos, siempre

Tabla 1. Algunos microorganismos modificados genéticamente (MMG) y su utilidad.

MMG	Utilidad	Mecanismos
<i>E. coli</i>	Obtención de insulina, interferones, hormonas de crecimiento.	Expresión del gen insertado que codifica para los anteriores productos.
<i>B. thuringiensis</i> <i>B. popilliae</i>	Control de plagas en la agricultura.	Inhibición del crecimiento y la reproducción o provocan la muerte inmediata.
Rizobia y Mycorrizas	Incremento en las cosechas y regeneración del suelo.	Fijación de nitrógeno, captura de fosfatos y micronutrientos.
Levaduras	Obtención de antígenos (Virus de Inmunodeficiencia Humana, hepatitis)	Expresión del gen insertado que codifica para dichos antígenos.

exista y para ello, se utilizan dos herramientas adicionales, la contención y la mitigación.¹

CONTENCIÓN Y MITIGACIÓN

La contención puede ser física o biológica. La contención física incluye el diseño y funcionamiento de instalaciones con el NBS apropiado y según la naturaleza del experimento (se utilizan invernaderos, mallas o redes para insectos, laboratorios especializados, etc.) para impedir mecánicamente la dispersión de estos organismos.

La contención biológica por su parte se logra cuando el organismo puede ser probado o utilizado en un lugar que tenga condiciones adversas para su supervivencia o dispersión, el cual se altera para permitir la sobrevida artificial como es el caso de zonas desérticas o frías. Los MMG que no resisten estas condiciones son más seguros de probar en dichos lugares con las condiciones alteradas, ya que un escape de ellos fuera de los perímetros de la instalación o al cesar los estudios no implicaría la supervivencia de éstos en el medio; puede también introducirse un gen suicida o alterar la capacidad de los MMG para utilizar los nutrientos.

La Unión Europea define "uso contenido" al que ha estado entre barreras físicas con o sin barreras adicionales físicas o químicas para evitar escapes o liberaciones al ambiente exterior. Para valorar el riesgo incluso en el laboratorio esta entidad sigue el esquema siguiente:²

■ Consideración de las propiedades predictivas del MMG para deter-

minar si hay algún mecanismo potencial por el cual pueda representar algún riesgo para la salud humana.

- Estudio de la probabilidad de que el MMG pudiera realmente causar daño a la salud humana.
- Valoración de la contención necesaria para salvaguardar la salud humana.
- Identificación de cualquier riesgo posible para el ambiente y asignar cualquier medida de contención adicional para asegurarse que el medio ambiente no estará en riesgo.

MITIGACIÓN

La mitigación está comprendida entre los planes de emergencia con medidas encaminadas a controlar las densidades de población microbiana.

Estas medidas pueden ser a corto, mediano o largo plazo¹ (Tabla 2).

La selección de un método determinado depende de la situación específica, la factibilidad y los costos. Cuando un MMG ha infectado plantas o animales y existe la posibilidad de causar efectos adversos, la incineración, el sacrificio o el enterramiento profundo puede ser una solución. Otras medidas se encaminan a la descontaminación, pero no logran la erradicación completa, se reduce incluso hasta concentraciones no detectables. Medidas más modernas y complicadas incluyen la utilización de genes letales que pueden atacar el ADN de las células o la pared, o mediante otros mecanismos. El control se puede lograr con un gen receptor que se activa en presencia de un compuesto particular en el ambiente.¹

Debe tenerse presente en todos los cálculos que la contención absoluta de los mo no es posible, por lo que pudiera ser más apropiado el término confinamiento.

Se han probado otros sistemas para controlar la liberación de los mo, así como la supervivencia en el ambiente una vez que han cumplido su función. Estos incluyen la sensibilidad a las bajas temperaturas donde no ocurre reparación del ADN.

Si es suelo y se trata de pequeñas parcelas, se han propuesto dos métodos alternativos para mo del género *Bacillus* fundamentalmente; la extracción de la capa superficial y tratamiento en autoclave o irradiación con ⁶⁰Co y la aplicación de vapor por debajo de planchas de PVC sobre el terreno, lo cual se repite en varias ocasiones para permitir la germinación de esporas y que el calor generado pueda eliminar las formas vegetativas con lo que se logran temperaturas entre 54 y 100 °C.

CONCLUSIONES

El riesgo en la manipulación y con las diferentes aplicaciones de los MMG siempre existe, como también los mecanismos para evaluarlos, evitarlos o reducirlos. En esto, la mano del hombre desempeña el papel fundamental.

La evaluación caso por caso y paso por paso es la piedra angular del enfrentamiento de estos riesgos que no pueden ser menospreciados, aun cuando en el laboratorio y en liberaciones controladas no se muestren reacciones adversas, de ahí, la necesidad de establecer las regulaciones pertinentes, para lo que pu-

Tabla 2. Métodos de control de las concentraciones de poblaciones microbianas modificadas genéticamente con efectos no deseables.

Microorganismo	Período		
	Inmediato*	Corto plazo**	Largo plazo***
Asociado a plantas, animales o a ambos.	Incineración.	Cuarentena.	Rotación de cultivos.
	Cuarentena.	Uso de productos químicos.	Mejoramiento del suelo.
	Inundación.	Rotación de cultivos.	Control de la erosión.
	Control de vectores.	Inundación por irrigación.	Control de insectos.
	Solear.	Tratamiento por calor.	Uso de antibióticos.
	Uso de productos químicos.	Solear el suelo.	Seguridad física.
De vida libre.		Control de la erosión del suelo.	Control de malezas.
	Fumigación.	Fumigación.	Fumigación.
	Inundación.	Inundación.	Inundación.
	Uso de productos químicos.	Uso de productos químicos.	Control de erosión.
		Control de erosión.	Control de malezas.
		Mejoramiento del suelo.	

* Desde horas hasta varios días para alcanzar efectividad.

** Desde varios días hasta 3 años para alcanzar efectividad.

*** Más de 3 años.

dieran ser una buena guía, las directrices técnicas del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente, los resultados de las actuales negociaciones de un Protocolo de Bioseguridad de acuerdo con el Artículo 19.3 del Convenio de Biodiversidad y el Decreto Ley 190 de la Seguridad Biológica del Consejo de Estado de la República de Cuba.

Las posibilidades de que las modificaciones genéticas puedan afectar el rango de huésped o el organismo huésped o su capacidad para utilizar diferentes sustratos, o que pudiera convertir el huésped en patógeno, o alterar su equilibrio con poblaciones relacionadas ecológicamente, tienen que ser todas consideradas, lo mismo pudiera ocurrir con mo nuevos no antes conocidos, con la diferencia de que los MMG contienen genes y producen compuestos que normalmente no se encuentran en los mo que les dieron origen.

El conocimiento y las precauciones sin embargo, deben y pueden llevar a afirmar que más que una amenaza, la biotecnología en general y los MMG en particular, constituyen la esperanza de muchos pueblos.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Seguridad Biológica del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente y en especial a su Director Ing. José Rodríguez Dueñas por el apoyo prestado y el interés de que este tema sea bien conocido y apropiadamente regulado, objetivo con el que los autores han intentado contribuir modestamente.

BIBLIOGRAFIA

1. Tzotzos G.T Genetically Modified Organisms. A guide to biosafety. UNIDO/ UNEP. CAB International, Oxford, United Kingdom, 1993.
2. United Nations Environment Program. Report of Panel IV: Considerations of the need for and modalities of a protocol setting out appropriate procedures including, in particular, advance informed agreement in the field of the safe transfer, handling and use of any living modified organism resulting from biotechnology that may have adverse effect on the conservation and sustainable use of biological diversity. Expert panels established to follow up on the Convention on Biological Diversity. Nairobi, Kenya, 1993.
3. Sasson A. Las Biotecnologías. Desafíos y Promesas. Centro de Investigaciones Biológicas, Ed. Oficina de Publicaciones del Consejo de Estado de la República de Cuba. UNESCO, La Habana, 1985.
4. ONUDI Código de conducta voluntario para la liberación de Organismos en el Medio Ambiente. Preparado por la Secretaría de la ONUDI para el grupo de trabajo oficioso ONUDI/PNUMA/OMS/FAO sobre seguridad de la Biotecnología, 1991.
5. Dale J. Transboundary movement of living modified organism resulting from modern biotechnology. Edited by K.J. Molongoy. International Academy of the Environment, Geneva, Switzerland, 1997.
6. Andrup L. Nielsen B H. and Kolvra S. Biosafety Considerations in industries with production methods base on the use of recombinant deoxyribonucleic acid. Scand. J. Work Environ Health, 16, 85, 1990.
7. Possee R.D. et al. Field Trials of Genetically Engineered Baculovirus Insecticides , Section II in Risk Assessment in Agricultural Biotechnology, USDA, California, USA, 50-61, 1998.
8. Kinderlehrer J. Contained use of Genetically Modified Organism, in Guide to Risk Assessment and Biosafety in Biotechnology, GRABB, 1997.
9. USGAO Biotechnology: Managing the Risk of Field Testing Genetically Engineered Organism Washington DC, USA, 1998.
10. Lindow S.E. Design and Results of Field Test of Recombinant Ice *Pseudomonas syringae* Strains, Section II in Risk Assessment in Agricultural Biotechnology, USDA, California, United States of America, 61-70, 1998.
11. WHO Strategies for Assessing the Safety of Foods Produced by biotechnology. FAO/WHO Geneva, Switzerland, 1991.
12. Wright S. Cuba Case Test Treaty. Bioweapons. The Bulletin of Atomic Scientist, 281-282, 1997.
13. Lundin S.J. Views on Possible Verification Measures for the Biological Weapons Convention. Stockholm International Peace Research Institute, 1991.
14. United Nation Research Institute for Disarmament. The Third Review of the Biological Weapons Convention; Issues and Proposals. Research Paper No. 9, United Nations, New York, USA, 1991.
15. Henderson D.A. Bioterrorism as a Public Health Threat. *Emerging Infectious Disease*, 4, Special Issue, 488, 1998.
16. Danzig R. and Berkousky P.B. Why should we be concerned about biological warfare? *JAMA*, 285, 431, 1997.
17. Sanhueza C. Hacia el fin de las Armas Biológicas. Colección Paz y Seguridad en las Américas. FIACSO, Santiago de Chile, Chile, 1998.
18. Laboratory CDC Health Canada. Laboratory Biosafety Guidelines 2nd Edition. Edited by M.E. Kennedy, Ontario, Canada, 1996.
19. OMS Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 2da Edición, Ginebra, Suiza, 1994.
20. González Sosa N. y Regalado Alfonso L. Aplicación de un Método Biológico en la Comprobación del Sistema de Tratamiento de Líquidos Residuales en un Laboratorio de Alta Seguridad (BL3). *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 28, 71, 1997.