

MODELO DE RESUMEN DE LA NOTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE DISTINTOS DE LAS PLANTAS SUPERIORES DE ACUERDO CON EL ARTÍCULO 11 DE LA DIRECTIVA 2001/18/CE

A. Información de carácter general:

1. Detalles de la notificación

a) Estado miembro de la notificación:	España
b) Número de la notificación:	B/ES/12/36
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación:	
d) Título del proyecto:	“Apoyo técnico científico entre el MARM y el laboratorio comunitario de referencia de la tuberculosis bovina para la realización de estudios epidemiológicos de tuberculosis bovina y de eficacia y mejora de la pruebas diagnósticas disponibles”
e) Período propuesto para la liberación:	3-4 meses a partir de concesión

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa:	Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) Universidad Complutense de Madrid
-------------------------------------	--

3. Definición de la OMG

a) Indíquese si el OMG es:	Viroide <input type="checkbox"/> Virus ARN <input type="checkbox"/> Virus ADN <input type="checkbox"/> Bacteria <input checked="" type="checkbox"/> Hongo <input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> - mamíferos <input type="checkbox"/> - insectos <input type="checkbox"/> - peces <input type="checkbox"/> - otro animal <input type="checkbox"/> especifique el phylum y la clase
Otro, especifíquese (reino, phylum y clase)	
b) Identidad del OMG (género y especie)	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>

c) Estabilidad genética, de acuerdo con el punto 10 de la letra A de la sección II del anexo III A: Después de 6 meses de pases en medio de cultivo y en SCID, la cepa ha demostrado ser estable. Estabilidad genética: Cultivos selectivos (agar Middlebrook 7H10 preparado según las instrucciones del proveedor con suplemento ADC y con glicerol), PCR, Hibridación de ácidos nucleicos: Southern-blot.

4. Tiene previsto el mismo notificador la liberación de ese mismo OMG en algún otro lugar de la Comunidad (de acuerdo con el apartado 1 del artículo 6)?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, indique el código del país:	

5. Ha notificado ese mismo notificador la liberación de ese mismo OMG en algún otro lugar de la Comunidad?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo: - Estado miembro de la notificación: - Número de la notificación:	

6. Ha notificado el mismo notificador u otro la liberación o comercialización de ese mismo OMG fuera de la Comunidad?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
NO LO SABEMOS Creemos que no. En caso afirmativo: - Estado miembro de la notificación: - Número de la notificación:	

7. Resumen del impacto ambiental potencial de la liberación de los OMG

El estudio para el que solicitamos autorización es la Determinación de la eficacia del mutante en el gen *phoP* de *Mycobacterium tuberculosis* SO2 como alternativa vacunal frente a la tuberculosis en ganado caprino infectado experimentalmente, concretamente en 24 animales, 12 vacunados y 12 controles en la granja experimental de la Facultad de veterinaria de la UCM. Procedimiento de experimentación que cumple con lo establecido en el real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Con objeto de evaluar la excreción de la cepa vacunal después de vacunar, previamente, se ha llevado a cabo un estudio con la vacuna viva del mutante en el gen *phoP* de *Mycobacterium tuberculosis* SO2 en ganado caprino domésticos para determinar su posible excreción por heces u orina en las horas posteriores a su administración, así como la persistencia en los tejidos en el laboratorio de nivel de bioseguridad 3 de nuestras instalaciones, VISAVET. El objetivo principal de este ensayo, fue conocer si existe un alto riesgo de excreción al medio ambiente de la

cepa vacunal en las horas posteriores a su **aplicación vía subcutánea** y empleando **dosis muy superiores** a las que se emplearán en la prueba de eficacia.

Para el ensayo se emplearon **cuatro cabras** (machos) menores de 1 año de edad (aproximadamente dos meses), procedentes de rebaños libres de tuberculosis. Los animales se vacunaron empleando una **dosis 100 veces superior** a la recomendada inicialmente ($2,5 \times 10^5$ CFUs vía subcutánea -SC- en la región pre-escapular). Todo los procedimientos de llevaron a cabo en el **laboratorio de bioseguridad de nivel 3**.

Transcurridas **24 horas** desde la aplicación de la vacuna, se sacrificaron dos animales. Se realizó necropsia para la recogida de **muestras tisulares** de diferentes órganos: pulmón, linfonodos respiratorios, hígado, riñón, intestino y linfonodos mesentéricos. Se recogieron **muestras de heces y orina** (de recto y mediante punción de la vejiga respectivamente). Transcurridas **48 horas** desde la aplicación de la vacuna se sacrificaron los dos animales restantes y se repitió el procedimiento. Todos los órganos fueron empleados para la realización de cultivo microbiológico (empleando medios enriquecidos con ADC) y determinación de la presencia del mutante en los mismos mediante extracción directa del material genética y posterior reacción de PCR.

Aunque no existen datos sobre la excreción de la cepa vacunal por heces y orina tras su administración, existen datos sobre la eliminación de la vacuna BCG por heces, aunque únicamente cuando se administra vía oral, no siendo el caso de este estudio.

No se identificó mediante PCR ADN de la cepa vacunal en ninguna de las muestras analizadas. Se observó un ligero incremento de los linfonodos pre-escapulares del lado donde se aplicó la vacuna (derecho), aunque en estas muestras no se llevó a cabo extracción de ADN. El cultivo bacteriológico hasta la fecha es negativo, aunque se mantendrá en incubación hasta 3 meses antes de considerarlo definitivamente negativo.

Los resultados de este estudio indican que no se produce excreción de la cepa vacunal por heces u orina 48 horas tras su administración vía subcutánea incluso empleando dosis 100 veces superiores a las inicialmente recomendadas. La persistencia de la bacteria podría producirse en ciertos tejidos, aunque no en aquellos órganos relacionados directamente con una posible excreción al medio ambiente a través de heces, orina u otras secreciones.

Además se van a llevar a cabo las siguientes medidas adicionales:

MEJORAS EN GRANJA: Conforme a la inspección del pasado 21 de diciembre de 2012 CNB, se va a proceder a realizar las siguientes mejoras en la granja experimental donde se va a desarrollar la prueba con el fin de asegurar más la zona y dificultar la salida y entrada de materiales y/o animales potencialmente contaminados:

- cerramiento de la granja, subiendo las teleras existentes hasta dos metros de altura y colocación de alambra en todo el cerco.
- Cerrar cobertizo de animales con chapa en los frontales hasta un metro de altura y colocación de telera hasta el techo.
- Colocar cerrojos de seguridad para evitar el acceso a personal no autorizado.

VIGILANCIA DIARIA:

Por el personal cuidador de los animales, personal investigador y Unidad de Control y Seguridad de la UCM

RETIRADA DE RESIDUOS

Limpieza semanal del suelo del cobertizo y eliminación de los residuos en contenedores de biosanitarios retirados por empresa autorizada.

PROGRAMA DE VIGILANCIA DEL OMG: toma de muestras periódica (semanal/quincenal según resultados) de estos residuos (heces, paja del suelo) .

TRASLADO Y NECROPSIA DE LOS ANIMALES A LABORATORIO SEGURIDAD BIOLÓGICA DE NIVEL 3 DE VISAVET: Una vez eutanasiados los animales, se trasladarán en doble bolsa de galga gruesa para la realización de la necropsia.

Por otro lado, las micobacterias en general, son organismos aerobios estrictos, resistentes a la desecación y la congelación aunque relativamente sensibles al calor y la luz solar. No poseen forma esporulada aunque las características de su pared les confiere cierta resistencia. Además, las micobacterias causantes de tuberculosis en el hombre (nuestro caso) y los animales son de crecimiento lento. La transmisión de la bacteria sólo puede realizarse hospedadores que tengan una infección activa. La infección se produce al inhalar gotas microscópicas (gotas Flügge) que contienen la bacteria. En medicina humana se ha observado que un paciente con tuberculosis activa sin tratamiento puede infectar entre 10-15 personas por año.

En este caso además se trata de una cepa atenuada, que se ha demostrado que tiene una capacidad menor para multiplicarse in vitro en macrófagos de ratón e in vivo por infección intravenosa en el modelo de ratón. En este mismo estudio (C. Martin et al. / Vaccine 24 (2006) 3408-3419) demostraron que la cepa SO2 M. tuberculosis es bastante más atenuada que la parental M. tuberculosis MT103 y que la BCG en ratones SCID. Además la restauración del gen Phop en la cepa atenuada hace que vuelva a ser virulenta confirmándose que la atenuación es debida a la mutación.

B. Información sobre el organismo receptor o sobre los organismos parentales de los que se deriva el OMG

1. Identificación del organismo receptor o parental

a) Indíquese si el organismo receptor o parental es :

- Viroide
- Virus ARN
- Virus ADN
- Bacteria
- Hongo
- Animal
- mamíferos
- insectos

- peces <input type="checkbox"/> - otro animal <input type="checkbox"/> (especifique el phylum y la clase) Otros, (especifíquense):

2. Nombre

i) Orden y taxón superior (animales):
ii) Género: MYCOBACTERIUM
iii) Especie: TUBERCULOSIS
iv) Subespecie:
v) Cepa: MT103
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.):
vii) Nombre vulgar:

3. Distribución geográfica del organismo

a) Autóctono del país que notifica o establecido en él: Distribuido mundialmente Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/>
b) Autóctono de otros países de la Comunidad o establecido en ellos: i) Sí <input type="checkbox"/> En caso afirmativo, indíquese el tipo de ecosistema en que se encuentra: Atlántico <input type="checkbox"/> Mediterráneo <input type="checkbox"/> Boreal <input type="checkbox"/>

Alpino	<input type="checkbox"/>
Continental	<input type="checkbox"/>
Macaronésico	<input type="checkbox"/>
ii) No	<input checked="" type="checkbox"/>
iii) No se sabe	<input type="checkbox"/>
c) ¿Se usa frecuentemente en el país que notifica? Está presente en el país.	
Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
d) ¿Es frecuente su tenencia en el país que notifica?	
Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>

4. Hábitat natural del organismo

a) Si es un microorganismo:	
Agua	<input type="checkbox"/>
Suelo, en libertad	<input type="checkbox"/>
Suelo, en simbiosis radiculares de plantas	<input type="checkbox"/>
En simbiosis con sistemas foliares o caulinares de plantas	<input type="checkbox"/>
En simbiosis con animales	<input type="checkbox"/>
Otros , (especifíquense): Individuos con tuberculosis	
b) Si es un animal , hábitat natural o ecosistema agrícola habitual:	

5.a) Técnicas de detección

Aislamiento mediante cultivo microbiológico empleando medios selectivos especiales (Löwenstein-Jensen, Coletsos, Herrolds) a partir de muestras clínicas conteniendo el bacilo.

5.b) Técnicas de identificación

Identificación mediante PCR. Existen pruebas comerciales que permiten diferenciar entre diferentes especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En el ámbito veterinario, suele determinarse si es una especie incluida en el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante una PCR múltiple y en caso afirmativo se aplica la técnica de DVR-spoligotyping, que permite determinar la especie y cepa concreta causante del brote

6. Está clasificado el organismo receptor con arreglo a las normas comunitarias vigentes en relación con la protección de la salud humana y el medio ambiente?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese: RD664/1997, grupo de riesgo 3 (Directiva 90/679/CEE)	

7. ¿Es el organismo receptor, vivo o muerto (incluidos sus productos extracelulares), apreciablemente patógeno o nocivo de cualquier otra forma?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo		
a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?:		
humanos	<input type="checkbox"/>	
animales	<input type="checkbox"/>	
plantas	<input type="checkbox"/>	
otros	<input type="checkbox"/>	
b) Aporte la información pertinente especificada en la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección 11 del anexo III A de la Directiva 2001/18/CE.		

8. Información sobre reproducción

a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:???
Se considera que la multiplicación es lenta, como en el resto de las micobacterias del complejo <i>M. tuberculosis</i> , aunque no existen estudios específicos al respecto.
b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado:
En caso que existiera la liberación del OMG al ecosistema la supervivencia y replicación en el mismo sería inexistente, ya que el OMG tiene una multiplicación más lenta que el resto de micobacterias pertenecientes al complejo <i>M. tuberculosis</i> , y requiere de unos medios nutritivos muy específicos.
c) Modo de reproducción
Sexual <input type="checkbox"/> Asexual <input checked="" type="checkbox"/>
d) Factores que afectan a la reproducción:
La multiplicación de la cepa parental se realiza en los macrófagos del hospedador. En el caso del OMG, al estar genéticamente modificado, su tasa de replicación es más lenta.

9. Capacidad de supervivencia

a) Capacidad de formar estructuras que favorezcan la supervivencia o el letargo
(i) endosporas <input type="checkbox"/>
(ii) quistes <input type="checkbox"/>
(iii) esclerocios <input type="checkbox"/>
(iv) esporas asexuales(hongos) <input type="checkbox"/>
(v) esporas sexuales (hongos) <input type="checkbox"/>
(vi) huevos <input type="checkbox"/>
(vii) pupas <input type="checkbox"/>
(viii) larvas <input type="checkbox"/>
(ix) otras (especificquense) <input type="checkbox"/>
b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia
Posee una pared bacteriana conformada por lípidos de elevado peso molecular que le confieren cierta resistencia frente a condiciones adversas.

10.a) Vías de diseminación

Las micobacterias son organismos aerobios estrictos, resistentes a la desecación y la congelación aunque relativamente sensibles al calor y la luz solar. No poseen forma esporulada aunque las características de su pared les confiere cierta resistencia. Además, las micobacterias causantes de tuberculosis en el hombre y los animales son de crecimiento lento. La transmisión de la bacteria sólo puede realizarse hospedadores que tengan una infección activa. La infección se produce al inhalar gotas microscópicas (gotas Flügge) que contienen la bacteria. En medicina humana se ha observado que un paciente con tuberculosis activa sin tratamiento puede infectar entre 10-15 personas por año

10.b) Factores que afectan a la diseminación

Ver punto anterior.

11. Modificaciones genéticas previas del organismo receptor o parental de las que ya se ha notificado la liberación en el país notificador (se darán los números de la notificación)

--

C. Información sobre la modificación genética

1. Tipo de modificación genética:

- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| i) Inserción de material genético | <input checked="" type="checkbox"/> |
| ii) Eliminación de material genético | <input type="checkbox"/> |
| iii) Sustitución de una base | <input type="checkbox"/> |
| iv) Fusión celular | <input type="checkbox"/> |
| v) Otro (especifíquese) | <input type="checkbox"/> |

2. Resultado que se pretende obtener mediante la modificación genética

Inactivación de genes de virulencia

3.a) ¿Se ha usado un vector en el proceso de modificación?

Sí

No

En caso negativo, pase a la pregunta 5.

3.b) En caso afirmativo, ¿está presente el vector, total o parcialmente, en el organismo modificado?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso negativo, pase a la pregunta 5	

4. Si ha contestado afirmativamente a la pregunta 3 b), aporte la información siguiente

a) Tipo de vector	
plásmido	<input checked="" type="checkbox"/>
bacteriófago	<input type="checkbox"/>
virus	<input type="checkbox"/>
cósmido	<input type="checkbox"/>
Elemento de transposición	<input type="checkbox"/>
Otros (especifíquense):	<input type="checkbox"/>
b) Identidad del vector: Plasmidos replicativos condicionales a la temperatura o plásmidos replicativos en micobacterias	
c) Gama de organismos huéspedes del vector: E.coli/Mycobacterium: shuttle vector	
d) Presencia en el vector de secuencias que den un fenotipo seleccionable o identificable	
Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Resistencia a los antibióticos	<input checked="" type="checkbox"/>
Otras, (especifíquense)	
Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta: kanamicina	

e) Fragmentos constituyentes del vector Referencia artículo: Perez et al. Molecular Microbiology. 2001

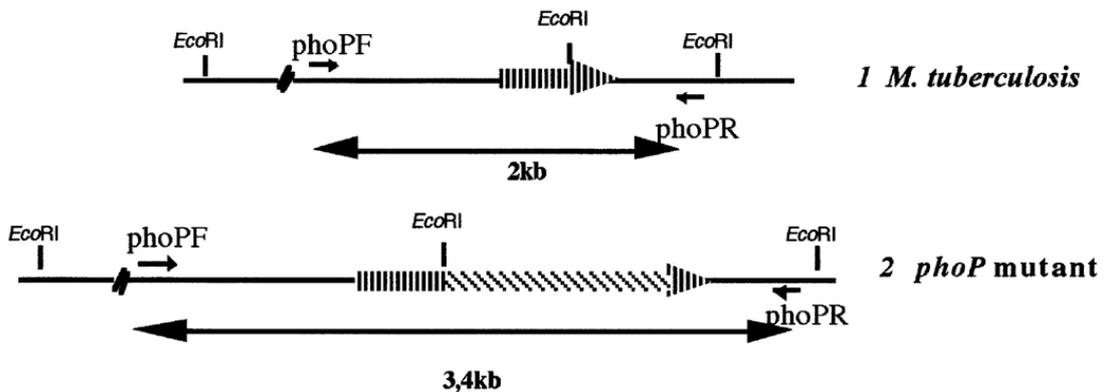
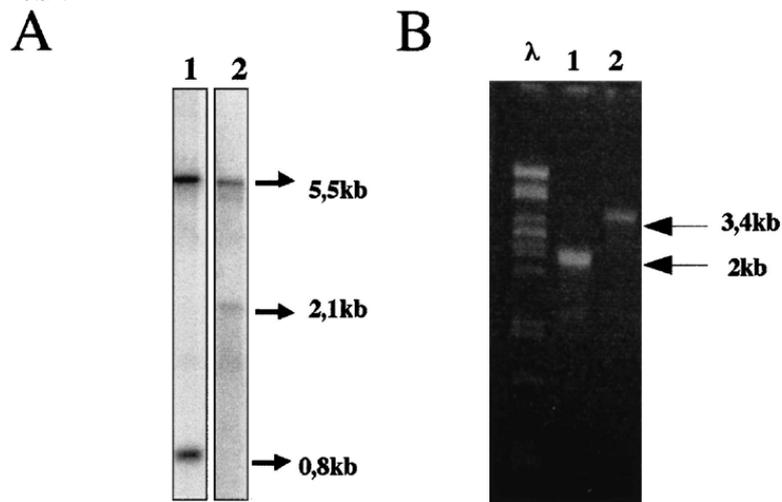
Un fragmento de 2Kb de DNA que contiene el gen *phoP* se interrumpió con un marcador kanamicina resistente para construir el plásmido pSO4 (*phoP*:: Km). Este plásmido pSO4 se usó para construir la cepa *M.tuberculosis phoP* mutante por recombinación homologa. Los mutantes fueron seleccionados por 10 Ministerio de Medio Ambiente

resistencia a la kanamicina y a la sacarosa a 39°C. Las características de la construcción fueron confirmadas por PCR (reacción en cadena de polimerasa) observándose el intercambio alélico.

Fig. 1. Disruption of the *phoP* gene in *M. tuberculosis*.

A. Genomic DNA from the wild-type *M. tuberculosis* MT103 and the *M. Tuberculosis phoP* mutant strains digested with *EcoRI* and probed with a 3.3 kb DNA fragment representing the cloned region. The absence of the 0.8 kb fragment and the presence of a 2.1 kb fragment in the mutant strain results from the insertion of the km cassette marker in the interrupted *phoP* gene. Lane 1, the parental strain *M. tuberculosis* MT103; lane 2, *M.tuberculosis phoP* mutant.

B. PCR profile of the chromosomal organization of the *phoP* gene in the parental and mutant strains of *M. Tuberculosis* clinical isolate MT103. Primers used for amplification are indicated (*phoPF* and *phoPR*). Lambda phage digested with *PstI* was used as a marker. Lane 1, the parental strain *M. tuberculosis* MT103; lane 2, *M. tuberculosis phoP* mutant.



f) Método de introducción del vector en el organismo receptor

i) transformación

ii) electroporación

iii) macroinyección

iv) microinyección	<input type="checkbox"/>
v) infección	<input type="checkbox"/>
vi) otros, (especifíquense)	

5. Si las repuestas a C. 3) a) y b) son negativas, ¿qué método se siguió en el proceso de modificación?

i) transformación	<input type="checkbox"/>
ii) microinyección	<input type="checkbox"/>
iii) macroencapsulación	<input type="checkbox"/>
iv) macroinyección	<input type="checkbox"/>
v) otros, (especifíquense)	

6. Información sobre el fragmento de inserción:

a) Composición del fragmento de inserción: Contestado en 4e

b) Fuente de cada parte constitutiva del fragmento de inserción: Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados son (Q 2001 Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 41, 179–187)

Table 1. Strains and plasmids used in this study.	Characteristics	References
Strains		
E. coli XL1 (for cloning and plasmid propagation)	recA1 lac Iq lacZDM15 Tn10	Sambrook et al. (1989)
M. tuberculosis	MT103 clinical isolate	Camacho et al. (1999)
phoP mutant	M. tuberculosis MT103 phoP mutant	Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 41, 179–187
Complemented	M. tuberculosis MT103 phoP mutant complemented (pSO5)	Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 41, 179–187
Plasmids		
pUC19	ColE1 replicon	Sambrook et al. (1989)
pPR27	Ts ori myco, sacB gene	Pelicic et al. (1997)
pNBV1	ori myco, Hygr	Howard et al. (1995)
pSO1	Insertion of phoP gene in pUC19	Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 41, 179–187
pSO3	Insertion of km cassette into phoP gene in pSO1	Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 41, 179–187
pSO4	Insertion of phoP::aph in pPR27	Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 41, 179–187
pSO5	Insertion of phoP gene in pNBV1	Blackwell Science Ltd, Molecular Microbiology, 41, 179–187

c) Función prevista de cada parte constitutiva del fragmento de inserción en el OMG
Ya contestado

d) Localización del fragmento de inserción en el organismo receptor:

- en un plásmido libre

- integrado en el cromosoma

- Otros especifíquense):

e) ¿Contiene el fragmento de inserción partes cuyo producto o función no se conozcan?

Sí

No

En caso afirmativo , especifíquese:

D. Información sobre el organismo u organismos de los que se deriva el fragmento de inserción (donante)

1. Indíquese si es:

Viroide	<input type="checkbox"/>
Virus ARN	<input type="checkbox"/>
Virus ADN	<input type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input checked="" type="checkbox"/>
Animal	<input type="checkbox"/>
- mamíferos	<input type="checkbox"/>
- insectos	<input type="checkbox"/>
- peces	<input type="checkbox"/>
- otro animal	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> (especifique el phylum y la clase):
Otros (especifíquense)	

2. Nombre completo

i) Orden y taxón superior (animales):
ii) Familia (plantas):
iii) Género: Escherichia
iv) Especie: E.coli
v) Subespecie:
vi) Cepa:

vii) Cultivar/línea de reproducción:
viii) Patovar:
ix) Nombre vulgar:

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

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese		
(a) ¿para cuál de los organismos siguientes?	humanos	<input type="checkbox"/>
	animales	<input type="checkbox"/>
	plantas	<input type="checkbox"/>
	otros	<input type="checkbox"/>
(b) ¿están implicadas de alguna forma las secuencias donadas en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?		
Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, proporcione la información pertinente de conformidad con la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II del Anexo III A:		

4. ¿Está clasificado el organismo donante con arreglo a normas comunitarias vigentes en relación con la protección de la salud humana y el medio ambiente como, por ejemplo, la Directiva 90/679/ CEE sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo , especifíquese:	

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

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
-----------------------------	--	-------------------------------------

E. Información sobre el organismo modificado genéticamente

1. Rasgos genéticos y características fenotípicas del organismo receptor o parental que hayan sufrido algún cambio como resultado de la modificación genética

a) ¿Se diferencia el OMG del receptor en lo que a capacidad de supervivencia se refiere? Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/> Especifíquese: La inactivación de <i>phoP</i> confiere atenuación de la virulencia tanto en modelo celular como en animal (SCDI) Ver artículos Perez et al, 20001 y C.Matin et al, Vaccine 2006
b) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta al modo o índice de reproducción? Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/> Especifíquese: Ver artículos Perez et al, 20001 y Vaccine 2006
c) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la diseminación? Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/> Especifíquese: menor replicación en macrófagos, menor patogenicidad
d) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad? Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/> Especifíquese: Pérdida de virulencia

2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente

Después de 6 meses de pases sucesivos en medio de cultivo, y en SCID, la cepa ha demostrado ser estable

3. ¿Es el OMG, vivo o muerto (incluidos sus productos extracelulares), apreciablemente patógeno o nocivo de cualquier forma?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo:		

a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?	humanos	<input type="checkbox"/>
	animales	<input type="checkbox"/>
	plantas	<input type="checkbox"/>
	otros	<input type="checkbox"/>
		<input type="checkbox"/>
b) Aporte la información pertinente especificada en la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II y en el inciso i) del punto 2 de la letra C de la sección II del anexo III A		

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG en el medio ambiente: PCR
b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG: Hibridación y secuenciación

F. Información sobre la liberación

1. Finalidad de la liberación (incluido todo beneficio ambiental potencial significativo esperado)

En la actualidad, en humanos se emplea la vacuna viva BCG (*M. bovis* bacillus Calmette-Guérin) para la prevención de la enfermedad (Dannenbergh, Jr., 2010). Se trata de una vacuna viva atenuada derivada de un aislado clínico de *M. bovis*, agente causal de la denominada tuberculosis bovina. Esta vacuna ha sido la de mayor uso en la historia y su administración ha permitido salvar miles de vidas. La vacuna BCG parece ser más efectiva frente a la tuberculosis infantil, siendo limitada su utilidad para prevenir casos de tuberculosis pulmonar en adultos, forma con la que existe un riesgo considerable de transmisión entre individuos. La falta de efectividad en estos casos ha sido achacada por algunos investigadores a la delección sufrida por la BCG durante el proceso de atenuación, en el cual se llegan a perder más de cien genes, entre lo que se incluyen algunos que localizados en la región RD1 y que codifican para antígenos importantes como ESAT-6. De hecho, se han llevado a cabo estudios en cobayas con vacuna BCG recombinante en la que se incluyeron los genes que codifican para ESAT-6 y en los que se observó un mayor índice de protección que empleando la vacuna BCG clásica (Pym et al., 2003).

Esta limitaciones detectadas en la vacuna BCG han impulsado la realización de nuevo estudios enfocados en el desarrollo de nuevas vacunas vivas que aporten un alto índice de protección frente a las diferentes formas de tuberculosis pulmonar y que sustituyan la vacuna disponible actualmente. A parte de la efectividad, otra de las premisas que deben cumplir estas alternativas vacunales son aquellas referentes a su seguridad. Actualmente, se está trabajando con una cepa mutante de *M. tuberculosis* (SO2) en la que se ha eliminado el gen *phoP*, que se relaciona

directamente con la virulencia de la cepa original al estar implicado en la regulación de diversas funciones necesarias para la supervivencia intracelular de la bacteria. Estudios pre-clínicos han permitido determinar que *M. tuberculosis* SO2 está más atenuado aún que *M. bovis* BCG y que confiere una protección mayor frente en desafíos experimentales en cobayas con dosis elevadas, sin causar un daño tisular significativo. Entre las posibles causas de esta mejora ostensible de la protección al emplear este mutante está la presencia de la región RD1, ausente en *M. bovis* BCG (Cardona et al., 2009; Martin et al., 2006).

2. ¿Es diferente el lugar de liberación del hábitat natural o del ecosistema en el que se utiliza, se mantiene o se encuentra regularmente el organismo receptor o parental?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese:	

3. Información relativa a la liberación y a la zona circundante

a) Localización geográfica (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda): ZONA SUBURBANA, FACULTAD DE VETERINARIA, AVDA PUERTA DE HIERRO S/N MADRID 28040 Latitud y longitud: 40.45081702512076,-3.7412524223327637 Google Maps: http://g.co/maps/f94ra Decimal: 40° 27' 2.9412"N, -3° 44' 28.5066"W
b) Área del lugar (m ²): (i) lugar real de la liberación (m ²): 70 (ii) área de liberación más amplia (m ²):
c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados: nO
d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG: Ver punto 7.

4. Método y amplitud de la liberación

a) Cantidad de OMG que vaya a liberarse: No hay liberación. Ver Pto. A 7. Las Dosis usadas por animal (12 en total) serán de 2,5 x 10 ³ CFUs aplicadas por vía subcutánea.

b) Duración de la operación: Una hora, vacunación de 12 animales

(c) Métodos y procedimientos para evitar o reducir al mínimo la propagación de los OMG más allá del lugar de liberación:

- Vacunación por veterinarios experimentados
- Disposición del material de vacunación (jeringas, agujas...) en dispositivos para punzantes y eliminación de los mismos por empresa autorizada para la eliminación de residuos biosanitarios especiales.
- EPIs eliminados de la misma forma.
- Acceso restringido a personal autorizado a la zona
- Unidad de Control y Seguridad de la UCM para vigilancia 24 horas 365 días al año, además de vigilancia por el personal cuidador e investigador
- Tratamiento de estos residuos disponiéndolos en contenedores de residuos biosanitarios y retirada por empresa autorizada.
- Granja de unos 70 metros cuadrados, techada, con 2 paredes y vallado con planchas para contener la zona
- Procedimiento de entrada-salida a la misma, uso de calzas y mono exclusivos.
- TRASLADO Y NECROPSIA DE LOS ANIMALES A LABORATORIO SEGURIDAD BIOLÓGICA DE NIVEL 3 DE VISAVET: Una vez eutanasiados los animales, se trasladarán en doble bolsa de galga gruesa para la realización de la necropsia.

5. Descripción resumida de las condiciones ambientales medias (clima, temperatura, etc.)

Mes	Temperatura media ^{°C}		Precipitación total media (mm)	Número medio de días de precipitación
	Mínima diaria	Máxima diaria		
Ene	2.6	9.7	37	9
Feb	3.7	12	35	9
Mar	5.6	15.7	26	7
Abr	7.2	17.5	47	11
May	10.7	21.4	52	12
Jun	15.1	26.9	25	7
Jul	18.4	31.2	15	3
Ago	18.2	30.7	10	3
Sep	15	26	28	5
Oct	10.2	19	49	9
Nov	6	13.4	56	9
Dic	3.8	10.1	56	11

6. Datos pertinentes sobre liberaciones anteriores del mismo OMG. si los hubiera, específicamente relacionados a las repercusiones potenciales de la liberación en el medio ambiente y la salud humana

--

G. Interacciones del OMG con el medio ambiente y repercusiones potenciales sobre este, si es apreciablemente diferente del organismo receptor o parental

1. Nombre del organismo objeto de investigación (si procede)

i) Orden y taxón superior (animales):
ii) Familia (plantas):
iii) Género:
iv) Especie:.
v) Subespecies:
vi) Cepa: Cepa atenuada <i>M. tuberculosis</i> SO2 (mutación del gen Phop). Numero de notificación: A/ES/09/07 del 02/03/2009. Numero de autorización CIOMG:03.12.09. Centro: Universidad de Zaragoza. Tipo de operación/OMG:2 Objeto de la modificación: Vacuna frente a la tuberculosis. Datos: http://www.marm.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/Notutilz-Julio-2010-tcm7-2850.pdf
vii) Cultivar/Línea de reproducción:
viii) Patovar:
ix) Nombre vulgar:

2. Mecanismo previsto y resultado de la interacción entre los OMG liberados y el organismo diana (si procede)

--

3. Otras interacciones potencialmente significativas con otros organismos en el medio ambiente

--

4. ¿Es probable que se dé una selección posterior a la liberación del OMG como, por ejemplo, una competencia mayor, un carácter más invasivo, etc.?

Sí	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe
Especifíquese:		

5. Tipos de ecosistemas a los que puede extenderse el OMG desde el lugar de liberación y en los cuales puede quedar establecido

La probabilidad de que se produzca la liberación es nula, pero para tomar las medidas preventivas necesarias, el experimento se realiza en una granja experimental situada en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

6. Nombre completo de los organismos que no son el organismo diana, pero que (teniendo en cuenta la naturaleza del medio ambiente receptor) pueden sufrir accidentalmente daños importantes por la liberación del OMG

i) Orden y taxón superior (animales):
ii) Familia (plantas):
iii) Género:
iv) Especie:
v) Subespecie:
vi) Cepa:
vii) Cultivar/línea de reproducción:
viii) Patovar
ix) Nombre vulgar:

7. Probabilidad de intercambio genético en vivo

a) Del OMG a otros organismos del ecosistema de liberación:

b) De otros organismos al OMG:
c) Consecuencias probables de la transferencia de genes:

8. Referencias de los resultados pertinentes (si los hay) de estudios sobre el comportamiento y las características del OMG sobre su repercusión ecológica llevados a cabo en ambientes naturales simulados (por ejemplo, microcosmos, etc.)

--

9. Posibles interacciones ambientalmente significativas con procesos biogeoquímicos (si son diferentes del organismo receptor o parental)

--

H. Información sobre el seguimiento

1. Métodos de seguimiento de los OMG

PROGRAMA DE VIGILANCIA DEL OMG: toma de muestras periódica (semanal/quincenal según resultados) de los residuos generados durante la prueba (heces, paja del suelo).

TRASLADO Y NECROPSIA DE LOS ANIMALES A LABORATORIO SEGURIDAD BIOLÓGICA DE NIVEL 3 DE VISAVET: Una vez eutanasiados los animales, se trasladarán en doble bolsa de galga gruesa para la realización de la necropsia.

Muestras de sangre. Tras el sacrificio de los animales, se procederá a realizar el seguimiento del OMG mediante toma de muestras y cultivo de las mismas en medios específicos (agar Middlebrook 7H10 preparado según las instrucciones del proveedor con suplemento ADC y con glicerol) y realización de PCR para determinar la existencia del OMG.

2. Métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema

No se espera que no haya liberación. Ver pto 7.ANEXO A

3. Métodos de detección de la transferencia del material genético donado del OMG a otros organismos

No se ha descrito, la mutación es estable. Los animales se sacrificarán una vez realizado el estudio, y no estarán en contacto con otras especies

4. Tamaño del área de seguimiento (m²)

Granja experimental de 70 m²

5. Duración del seguimiento

6 meses.

6. Frecuencia del seguimiento

El seguimiento se realizara de manera periódica (cada 15 días).

I. Información sobre el tratamiento posliberación y el tratamiento de residuos

1. Tratamiento del lugar tras la liberación

Aunque no se espera liberación al final de la experiencia se desinfectará la zona (suelos y paredes) con zotal o derivados del cloruro de didecildimetilamonio o del glutaraldehído.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación

Ver pto. anterior

3(a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Heces, orina producidas por 12 cabras durante 3-4 meses
Material clínico y EPIs empleados durante la prueba. 2 contenedores biosanitarios (aprox. 16 kilos cada uno)
Cadáveres de los animales
Cama de los animales (paja)

3(b) Tratamiento de residuos

Tratamiento de contenedores biosanitarios por la empresa FCC medioambiental autorizada y contratada por la Universidad Complutense a tal efecto

J. Información sobre planes de actuación en caso de emergencia

1. Métodos y procedimientos de control de la diseminación del OMG o de los OMG en caso de dispersión imprevista

Diagnóstico de tuberculosis en personal y animales expuestos
PCR o cultivo de muestras ambientales

2. Métodos de eliminación del OMG o de los OMG de las áreas potencialmente afectadas

Eliminación o desinfección antes descritas de los materiales, tratamiento de tuberculosis de las personas afectadas y sacrificio de animales en su caso

3. Métodos de eliminación o saneamiento de plantas, animales, suelos, etc. que pudieran ser expuestos al organismo durante la dispersión o después de la misma

Ya descrito, ver punto anterior

4. Planes de protección de la salud humana y del medio ambiente en caso de que se produzca un efecto no deseable

Vigilancia de la salud del personal implicado. Tal como se realiza por el FREMAP al personal de VISAVET que trabaja en el Servicio de micobacterias., tratamiento en su caso, etc.