



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

<b>Nº de Registro:</b>	<b>Nº de Notificación:</b>
------------------------	----------------------------

**I. INFORMACIÓN GENERAL**

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

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

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Antonio Domínguez Andreu  
NIF: 17978650-X  
Cargo: Director Gerente  
Tel: 976 71 65 50  
Fax: 976 71 63 35  
Correo electrónico: direccion.cita@aragon.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Pilar M<sup>a</sup> Muñoz Álvaro  
NIF: 08917172-A  
Cargo: Doctora investigadora  
Tel: 976 71 37 99  
Correo electrónico: pmmunoz@cita-aragon.es

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

Nombre y apellidos: José Antonio Domínguez Andreu  
NIF: 17978650-X  
Cargo: Director Gerente  
Tel: 976 71 65 50  
Fax: 976 71 63 35  
Correo electrónico: direccion.cita@aragon.es

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



Pilar M<sup>a</sup> Muñoz Álvaro

- 2) Debe señalarse si para la ejecución de esta actividad se recibe financiación del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación. 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      x                      NO     

- 3) Instalación donde se va a desarrollar la actividad de utilización confinada (cumplimente si previamente ha sido comunicada/autorizada para este tipo de actividades; en caso contrario, cumplimente el Formulario Parte B).

a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación:

30/10/15 (Laboratorio P3)

b) Número de referencia del expediente:

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

## II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Finalidad de la actividad:

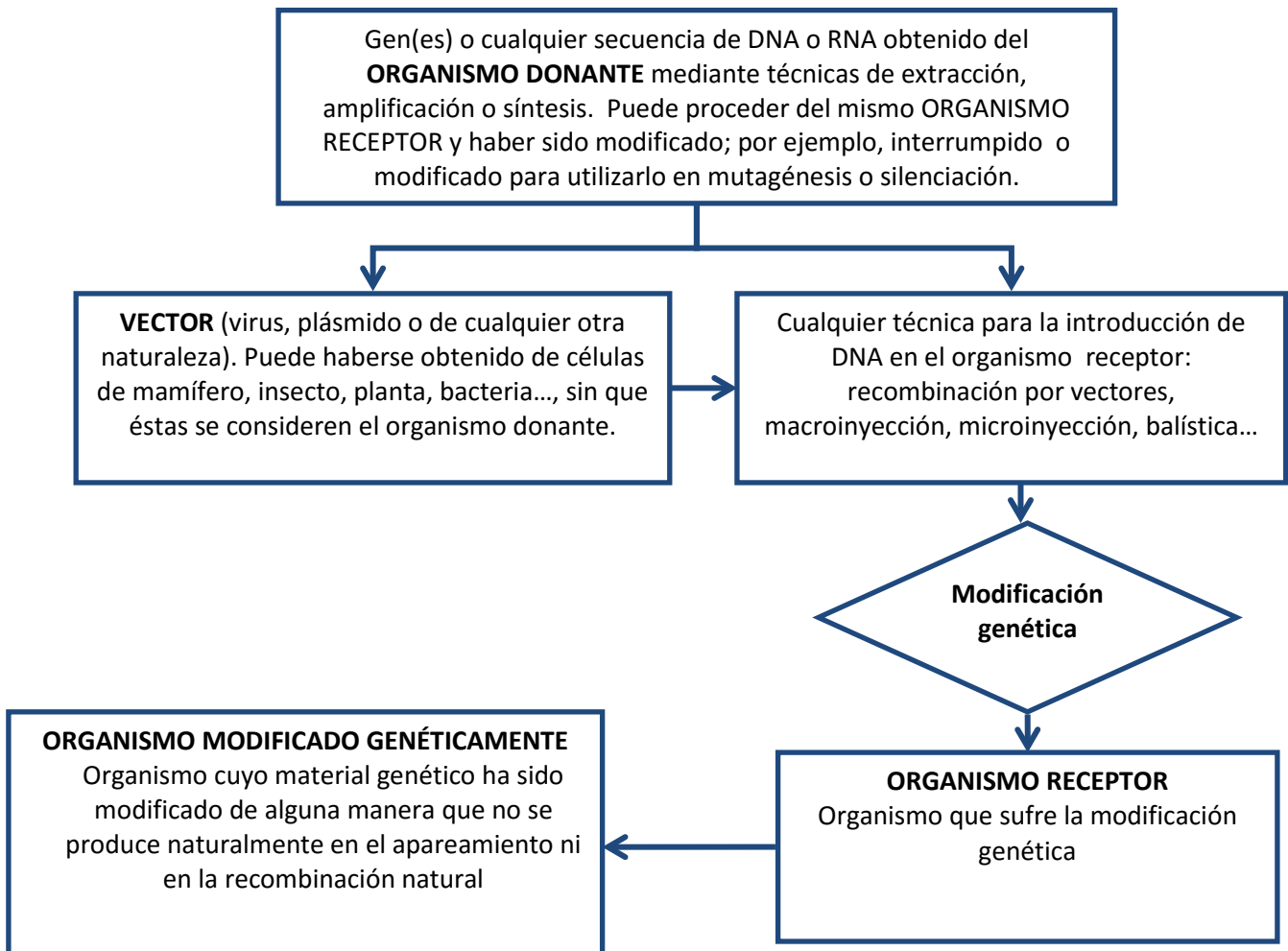
Caracterización de cepas candidatas a vacunas frente a la brucelosis

- 2) Clasificación de la actividad

Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y el anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las Notas de orientación para la evaluación del riesgo.

Tipo 1        
Tipo 2        
Tipo 3      x  
Tipo 4

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





**III. INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO RECEPTOR DEL CUAL SE DERIVA EL OMG**

**IV. INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO RECEPTOR DEL CUAL SE DERIVA EL OMG**

- 1) Nombre científico: *Brucella suis*,  
Taxonomía: Género Brucella; familia Brucellaceae  
Nombre común: Brucela suis

- 2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- a) Técnicas de aislamiento:

Las cepas de *B. suis*, se conservan liofilizadas en doble ampolla a -80°C en crioviales con crioprotectores (glicerol, leche descremada o suero fetal-DMSO), en un congelador situado en una zona P3. Se aíslan en placas de medio de cultivo rico (Blood Agar Base o Trypticase Soja) que se incuban a 37°C durante 2-5 días. Esta cepa se encuentra en la Universidad de Navarra, que es donde tiene lugar la construcción del correspondiente OMG.

- b) Técnicas de identificación:

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

Identificación molecular: PCR específica

- c) Marcadores genéticos:

Presencia de la secuencia IS711 o secuencias específicas de especie

- d) Marcadores fenotípicos:

Agglutinación con antisueros específicos.

- e) Estabilidad genética:

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

- 3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Sin modificaciones genéticas previas

- 4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI    x                      NO



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

Una dosis alta de este microorganismo vivo puede ser patógena para seres humanos y animales (principalmente rumiantes).

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

*Brucella suis*, (organismo receptor) está clasificada como patógeno tipo 3.

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

En humanos los principales síntomas son fiebre, debilidad, artromialgia y fibromialgia  
En animales (principalmente rumiantes), aborto y esterilidad.

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

SI    x                      NO   

Porqué: la bacteria no posee mecanismos de intercambio genético.

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

Si

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

Los investigadores que interviene en el proyecto (Dra. Pilar M. Muñoz, Dr. José M. Blasco y María Jesús de Miguel) llevan trabajando con distintas especies del género *Brucella* desde hace décadas y están familiarizados con todos los aspectos relativos a la bioseguridad del patógeno.

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

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

*Brucella suis* no se multiplica fuera de sus huéspedes o de las condiciones de cultivo. Sí es capaz de sobrevivir en el ambiente en determinadas condiciones, pero no de forma indefinida.



En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

- |      |                            |                          |
|------|----------------------------|--------------------------|
| i)   | esporas                    | <input type="checkbox"/> |
| ii)  | endosporas                 | <input type="checkbox"/> |
| iii) | quistes                    | <input type="checkbox"/> |
| iv)  | esclerocios                | <input type="checkbox"/> |
| v)   | esporas asexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |
| vi)  | esporas sexuales (hongos)  | <input type="checkbox"/> |
| vii) | otros, especifíquese       | <input type="checkbox"/> |

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

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

d) Posibles nichos ecológicos:

Ninguno fuera de los huéspedes animales naturales.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

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

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

Ninguno

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Ninguno

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

*Brucella suis* es una bacteria de distribución mundial que se encuentra habitualmente y de forma natural en suidos silvestres y domésticos (jabalí y cerdo principalmente). La biovariedad 5 de *B. suis* se ha aislado a partir de algunos roedores silvestres.

12) Hábitat natural del organismo:

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



#### IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

- 1) Nombre científico: *Brucella suis*  
Taxonomía: Género *Brucella*; familia *Brucellaceae*  
Nombre común: *Brucella suis*

- 2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

**Para cada construcción se obtuvo uno de los siguientes genes:**

**Construcción 1 (mutante en gen *mae*)**

Gen *mae* con una deleción de los codones 26 al 700 amplificada por PCR a partir del genoma de *B. suis*. (También llamada ORF o gen *mae* mutado)

**Construcción 2 (mutante en gen *fbp*)**

Gen *fbp* con una deleción de los codones 15 al 326 amplificada por PCR a partir del genoma de *B. suis*. (También llamada ORF o gen *fbp* mutado)

**Construcción 3 (mutante en gen *glpX*)**

Gen *glpX* con una deleción de los codones 21 al 205 amplificada por PCR a partir del genoma de *B. suis*. (También llamada ORF o gen *glpX* mutado)

**Construcción 4 (mutante en genes *fbp* y *glpX*)**

Gen *fbp* con una deleción de los codones 15 al 326 amplificada por PCR a partir del genoma de *B. suis*. (También llamada ORF o gen *fbp* mutado)

Gen *glpX* con una deleción de los codones 21 al 205 amplificada por PCR a partir del genoma de *B. suis*. (También llamada ORF o gen *glpX* mutado)

**Construcción 5 (mutante en genes *pckA* y *ppdK*)**

Gen *pckA* con una deleción de los codones 14 al 454 amplificada por PCR a partir del genoma de *B. suis*. (También llamada ORF o gen *pckA* mutado)

Gen *ppdK* con una deleción de los codones 35 al 859 amplificada por PCR a partir del genoma de *B. suis*. (También llamada ORF o gen *ppdK* mutado)

**Construcción 6 (mutante en genes *mae* y *pckA*)**

Gen *mae* con una deleción de los codones 26 al 700 amplificada por PCR a partir del genoma de *B. suis*. (También llamada ORF o gen *mae* mutado)

Gen *pckA* con una deleción de los codones 14 al 454 amplificada por PCR a partir del genoma de *B. suis*. (También llamada ORF o gen *pckA* mutado)

**Construcción 7 (mutante en gen *aceA*)**

Gen *aceA* con una deleción de los codones 11 al 419 amplificada por PCR a partir del genoma de *B. suis* (también llamada ORF o gen *aceA* mutado)

- 3) Método de obtención:

- a) Extracción   
b) PCR   
c) Síntesis *in vitro*



4) Función del gen/genes en el organismo donante

**Se detalla la función de los genes modificados en las distintas construcciones:**

Todos los genes están supuestamente implicados en el metabolismo de Brucella

**Construcción 1**

El gen *mae* original codifica la enzima málica

**Construcción 2**

El gen *fbp* original codifica un enzima con actividad Fructosa1,6 bifosfatasa

**Construcción 3**

El gen *glpX* original codifica un enzima con actividad Fructosa1,6 bifosfatasa II

**Construcción 4.**

El gen *fbp* original codifica un enzima con actividad Fructosa1,6 bifosfatasa

El gen *glpX* original codifica un enzima con actividad Fructosa1,6 bifosfatasa II

**Construcción 5**

El gen *pckA* original codifica una fosfoenolpiruvato carboxikinasa

El gen *ppdK* original codifica una piruvato fosfato dikinasa

**Construcción 6**

El gen *mae* original codifica la enzima málica

El gen *pckA* original codifica una fosfoenolpiruvato carboxikinasa

**Construcción 7**

El gen *aceA* original codifica una isocitrato liasa

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

SI    X                      NO   

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i)	seres humanos	X
ii)	animales	X
iii)	plantas	<input type="checkbox"/>

b) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

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

En animales (principalmente suidos): aborto y esterilidad

c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?

No





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

## V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

- 1) Tipo de modificación genética:

- a) Inserción de material genético           X  
b) Deleción de material genético           X  
c) Sustitución de bases                     
d) Fusión celular                             
e) Otros, especifíquese

- 2) Finalidad de la modificación genética:

La finalidad de cada una de las construcciones es obtener mutantes defectuosos en el metabolismo de *Brucella* en los cuales se Generar atenuación o avirulencia

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

**Se seguirá el mismo procedimiento para todas las construcciones**

Nota: el gen de interés puede ser *mae* o *fbp*, o *glpX* o *fbp-glpX* o *pckA-ppdK* o *mae-pckA* o *aceA*:

El gen **de interés** mutado se clonará en el vector pJQK. El plásmido derivado de pJQK en el que se ha clonado **el gen de interés** mutado se introducirá en *Brucella suis* por conjugación. El plásmido es suicida y no puede replicarse en *Brucella suis*. Se producirá la recombinación homóloga entre el gen salvaje presente en el cromosoma y el gen mutado presente en el plásmido.

El resultado final de este proceso es la sustitución, en el cromosoma de *Brucella suis*, del **gen de interés** salvaje por el **gen de interés** mutado. El organismo obtenido tiene una mutación no polar y no lleva ningún marcador de resistencia a antibiótico adicional. El plásmido suicida, al no poder replicarse en *Brucella suis*, se extingue. Para más información ver la referencia:

Conde-Álvarez, R., Grilló, M.J., Salcedo, S.P., de Miguel, M.J., Fugier, E., Gorvel, J.P., Moriyón, I. and M. Iriarte. 2006. Synthesis of phosphatidylcholine, a typical eukaryotic phospholipid, is necessary for full virulence of the intracellular bacterial parasite *Brucella suis*. Cell. Microbiol. 8: 1322-1335

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

SÍ    **X**    NO   

En caso afirmativo:

- a. Tipo e identidad del vector:

**Se utilizará el mismo plásmido para realizar todas las construcciones**

Plásmido derivado del vector pJQK (también llamado pJQKm) (Scupham and Triplett, 1997)

El vector pJQK y sus derivados son suicidas (es decir no pueden replicarse) en *Brucella suis*, y ello lleva a la extinción del plásmido. En este vector se clonará el **gen de interés** mutado.

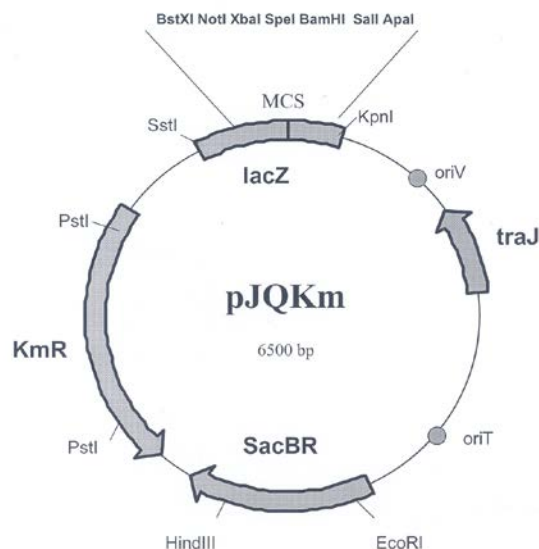
Referencia donde se describe el vector pJQK: Gene 1997 (202): 53-59

b. Si se trata de un virus: No procede

Es defectivo en replicación      Sí          NO   

c. Aportar mapa de restricción del vector (funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes en el vector):

Se muestra la carta del vector pJQK (pJQKm) con los genes y sitios de restricción más significativos. En el polisitio de clonage (MCS) se clonará el **gen de interés** mutado.



**Características más importantes del vector pJQKm y sus derivados**

**KmR:** Gen que confiere resistencia a Kanamicina.

**sacBR:** Gen que confiere la sensibilidad a la sacarosa

**oriV:** Origen de replicación (p15a ori de pACYC184). Funcional sólo en enterobacterias

**oriT:** Origen de transferencia RP4. Permite la movilización del plásmido en bacterias Gram negativas



**lacZ $\alpha$** : codifica el péptido alfa de la beta-galactosidasa. Permite la identificación de fragmentos clonados

**traJ**: codifica la proteína que se une a oriT y se requiere para la transferencia del plásmido durante el proceso de conjugación

- d. Gama de hospedadores del vector:  
Enterobacterias
- e. Características de la movilidad del vector:  
i) factores de movilización

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

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

No procede

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

Sí, pero únicamente en las condiciones de movilización descritas arriba

5) Información del inserto:

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

**Se señala el inserto para cada una de las construcciones**

**Construcción 1**

Para la construcción de un mutante en gen *mae*

Inserto de 717 bp pares de bases con el **gen *mae* mutado**

```
TATGACGGCGCACTTGTCTATCCGCCGGAGCCAGGTCTGTGGGGCTGATCGGTTCCAGTG
CCCATCACACCTCTCACCATATTTTCATGTGACAGATTACACTCACGATCTGCCATTTTGG
AAAAACTCATTATAGAAAATGAGCCTACTGCTATTTGGAACCTTAGGCTAAAAACACAAT
AATCGGCCCGGCGTACAGCCAATACGCCTTTTACGCGCTCTATTTTTCCCGAATTAAGCG
CGAAAGAATTGGAAAGCGATGCAAGATGACCAAGAAACCTTCTCCCTTCGACGCGCTC
TGACTTCGACGAAGCGGCGCTGTTCTTCCATCGCTATCCGAGCGAAGCCAATCTTCTGGT
ATTCCCGAACCTCGATGCAGCAAACATCACACTTAATGTGGTCAAGGCCGTCACGGATGC
GCTGCATGTTGGCCCAATTCCTTCTTGGAGCAACCCGTCGGGCCATATTCTGACGCCTTC
CGTCACATCGCGCGGTGTCGTCAACATGACGGCGCTGGCCGTCGTCGAAGCCTTGCAAAA
GAACGCCAGCAATCGTCGGCAGAAGTAATTTTAGATTATGCTTTAAAAGCATATTGAAGT
ATTAGACGAATAAAACGCCGGGTATGACAATGGTTATACTCGGCGTTTACTTTTTATTAA
AGCCATACGACAATAATCTCACTCACGAACAACGGGGTTGAGGTTCTGTTTTATGGCG
```

**Construcción 2**

Para la construcción de un mutante en gen *fbp*

Inserto de 396 bp pares de bases con el **gen *fbp* mutado**

```
GTAGCCAAAAAGCCCAGGTTTCATGGCTTTCCGATTGGCAAGGAGGTTGCCGCTCATGAAC
TTCGCCCGCCCGTATTCGATAAGCTGCAACGTGTACAATGCATTTCGCGTGCTTTCCCTC
GATACCGCGCATCTTGCCGGGGATTTTCAGGAGCAGGGCCAATGACATTGGTAGGTAATT
TTTCTCCTCTGGTTCTGGTTGGCGTGGCCGAAGAGGTGGATATCCTCGGCGAATATTTTCG
```



TGAAATAACCTGATCTCACATCGACTAGGAGGCTAGAAATGGCGCGTATTACGCTGCGGC  
AATTGCTCGATCACGCCGCTGAAAAGGGTTACGGCGTTCCGGCATTCAACATCAACAACA  
TGGAACAGGCACTGGCCATCATGGAAGCGGCAAATG

### **Construcción 3**

Para la construcción de un mutante en gen *glpX*

Inserto de 1150 bp pares de bases con el gen *glpX* mutado

ACGGTGATTCTGGTGACACATGAGACAACCGAATCTGCGGTCAAGAAGGCTCTGGAAGCC  
ATTCGAAAGACGATCATCTGGTGGACAAGCCGCAGATGATCCGCATTGAACGCGCTGGC  
TGAGTGTGTTCCCCATCAAGGTTTTGCGACCTCAGGATTGGACGAATTCCGTTACAT  
CCGACCGGTGCATGAAACGAAGCGTGTAGAGCTCAGAGCGGTTCCATTTTAATAGAGTC  
GTTGGAACCACTCTAACTATTTGTTTTGTTCGCATTATCCGACGCATCGAAGCGGGATCAG  
AAATCAGTCCAGTGGACTGATTTCCCCGCGTAGGCGTTTTCACACTTTTGCTGGAATGCT  
CTAAATCGATTAAGGCTTTGAGCGCGCACTGTTTTTAGCTCCTACACTCTTGCAAGGCTGT  
CGGGGACTTTGACAAAAGGTTTGAACAATGTCGCCATGGGGCGGCGATGGCGGGCGATGCC  
GCATAAACGCAATTCAAATTCAGGACTTTGTTCAAATGGCCAAGACCCGCAGAGCAGCACC  
CCCACGGGCTGGATCGCATTCTCACACTGGAGCTCGATACGACAGATCCGGACGAGACCG  
GCATCGACATCTATATCGGCATTGGCGGTGCGCCTGAAGGTGTTCTGGCTGCTGCGGCGC  
TTCGCTGCATCGGTGGCCAGATGCAGGGCCGTTTGCAGCTCAATACCGAAGAGAAGGTTG  
CCCGTGCCGCCAAGATGGGTATTTCCGATCCGAAAAAGATCTATACTTTGGAGGAAATGG  
CCAAGGGCGATGTGCTCTTCGCGGCGACCGGCGTGACGGATGGCAATATGCTTTCCGGCG  
TGAAATTCGCGCGGGATTATATCCAGACCCATACGATCGTGATGCGCTCGTCGTCGAGA  
CGGTGCGTGAAATCAAGGCGCGCCATCAGGATTTGTCCAAATTCAGAGCATTTCAGCA  
AAAGTGTGAAACGGTTTTGCGTTGGAAAATGCGATAAAATAAATAGTTAGAGCGGTTCCA  
ACGATTCGTTTTAATCGGAACCGCTCTAGGACATATATGAGATCGAACGGCCTGCCGTT  
TCAGACCCCGAAAAGCGTATCGTTTTTCCGGGTTTTTGTATTTGATACGCTCCATCGGCAA  
CTGTATGATG

### **Construcción 4**

Para la construcción de un mutante en gen *fbp*

Inserto de 396 bp pares de bases con el gen *fbp* mutado

GTAGCCAAAAAGCCCAGGTTTCATGGCTTTCCGATTGGCAAGGAGGTTGCCGCTCATGAAC  
TTCGCCCCCGCCGATTCGATAAGCTGCAACGTGTACAATGCATTTCGCGTGCTTTCCCTC  
GATACCGGCATCTTGCCGGGGATTTTCAGGAGCAGGGCCAATGACATTGGTAGGTAATT  
TTTTCTCTCTGGTTCTGGTTGGCGTGGCCGAAGAGGTGGATATCCTCGGCGAATATTTTCG  
TGAAATAACCTGATCTCACATCGACTAGGAGGCTAGAAATGGCGCGTATTACGCTGCGGC  
AATTGCTCGATCACGCCGCTGAAAAGGGTTACGGCGTTCCGGCATTCAACATCAACAACA  
TGGAACAGGCACTGGCCATCATGGAAGCGGCAAATG

Para la construcción de un mutante en gen *glpX*

Inserto de 1150 bp pares de bases con el gen *glpX* mutado

ACGGTGATTCTGGTGACACATGAGACAACCGAATCTGCGGTCAAGAAGGCTCTGGAAGCC  
ATTCGAAAGACGATCATCTGGTGGACAAGCCGCAGATGATCCGCATTGAACGCGCTGGC  
TGAGTGTGTTCCCCATCAAGGTTTTGCGACCTCAGGATTGGACGAATTCCGTTACAT  
CCGACCGGTGCATGAAACGAAGCGTGTAGAGCTCAGAGCGGTTCCATTTTAATAGAGTC  
GTTGGAACCACTCTAACTATTTGTTTTGTTCGCATTATCCGACGCATCGAAGCGGGATCAG  
AAATCAGTCCAGTGGACTGATTTCCCCGCGTAGGCGTTTTCACACTTTTGCTGGAATGCT  
CTAAATCGATTAAGGCTTTGAGCGCGCACTGTTTTTAGCTCCTACACTCTTGCAAGGCTGT  
CGGGACTTTTGACAAAAGGTTTGAACAATGTCGCCATGGGGCGGCGATGGCGGGCGATGCC  
GCATAAACGCAATTCAAATTCAGGACTTTGTTCAAATGGCCAAGACCCGCAGAGCAGCACC  
CCCACGGGCTGGATCGCATTCTCACACTGGAGCTCGATACGACAGATCCGGACGAGACCG  
GCATCGACATCTATATCGGCATTGGCGGTGCGCCTGAAGGTGTTCTGGCTGCTGCGGCGC  
TTCGCTGCATCGGTGGCCAGATGCAGGGCCGTTTGCAGCTCAATACCGAAGAGAAGGTTG  
CCCGTGCCGCCAAGATGGGTATTTCCGATCCGAAAAAGATCTATACTTTGGAGGAAATGG  
CCAAGGGCGATGTGCTCTTCGCGGCGACCGGCGTGACGGATGGCAATATGCTTTCCGGCG  
TGAAATTCGCGCGGGATTATATCCAGACCCATACGATCGTGATGCGCTCGTCGTCGAGA  
CGGTGCGTGAAATCAAGGCGCGCCATCAGGATTTGTCCAAATTCAGAGCATTTCAGCA



AAAGTGTGAAACGGTTTTGCGTTGGAAAATGCGATAAAATAAATAGTTAGAGCGGTTCCA  
ACGATTCCGTTTTAATCGGAACCGCTCTAGGACATATATGAGATCGAACGGCCTGCCGTT  
TCAGACCCCGAAAAGCGTATCGTTTTTCGGGGTTTTTGATTTGATACGCTCCATCGGCAA  
CTGTATGATG

### **Construcción 5**

Para la construcción de un mutante en gen *pckA*

Inserto de 539 bp pares de bases con el gen *pckA* mutado

TGTTTTGCAGTTTTCCACACCCCGAAGCGCTCGGGTTAAACGATTTAAAAAATTTCAAAA  
ATTTTAAATCGATTAAATATTTGAATTTTCTCAATTAATCTGTTTCTGACTGCCATCCCC  
CATGAAAGCCAAACCAGGGGGACGCATTTTTTTAGTTAGTCAAACAGACGGCGGAGACATC  
ATGAAAGAGACCGGCATCCACAATAAGGCCGCTTCGATTGACGGCTCGCTGAACAATGCT  
GAATTCGGCATCGATCCGAATTCGGCTTCGCCGCTCCCTGTCGAAGTGCCGGGTGTGGAA  
AGCTCCATTCTCGATCCGCGCTCGACCTGAGCCGACAAAGTTGCCTATGACGCCCAGGCC  
AAGAAGCTGGTCGACATGTTTCGTTTTCCAACCTCGAGAAGTTTGAAGCCACGTCGACCAC  
GAGGTCAAGGATGCCGCACCGGCATCCGCATGGCTGCTGAATAGGTTTTAAGCATATTG  
AGGAGGGGGGAAGCCCGCCATCGCGCCGGGCTTCTTTTTTTGGCTGTTATCGCAAGAA

Para la construcción de un mutante en gen *ppdK*

Inserto de 509 bp pares de bases con el gen *ppdK* mutado

CTCCCATTCAATTTTTACGGGAGGCTCACCGTTTCTGGGTGCCTAATCGATTCTATTGT  
CGCGGCCCGACTTTTTTGGTTGGCCCTCGGCTTCTGATCGCATAAGCAACGCAAGCAGGT  
TCAGGGAGTGCTTGCAGCAATTGCAGGCTTTTCGGAACCTTGTCTGTGTCAAGGGAGG  
CCGGAATGGCAAAGTGGGTGTACACGTTTCGGTGATGGCAAGGCGGAAGGGGCTCGGAGCG  
ATCGCAACCTTCTCGGGCGCAAGGGGGCGAACCTGGCTGAAATGAGCAACGGGTCTCGAC  
TATGTGCTCCTGCTCGCCTTTCGTTGCGCGATCGCCCGCTTTCGGCGGCGCAGGCAGCC  
GTGCGCAAAGTGTAAACCGCTGCCATAATTCAGCTTTACTGCCGGGTTAGTTAGCGACTG  
CTAATGCGTTTTTCGAGCCAAAAGTGCGAAGCGCCGATGCGGGGAAATCAGTCCACTGGAC  
TGATTTCCGCTTCTGCTTTGATGCGTTGA

### **Construcción 6**

Para la construcción de un mutante en gen *mae*

Inserto de 717 bp pares de bases con el gen *mae* mutado

TATGACGGCGCACTTGTCTATCCGCCGGAGCCAGGTCTGTGGGGCTGATCGGTTCCAGTG  
CCCATCACACCTCTCACCATATTTTCATGTGACAGATTACACTCACGATCTGCCATTTTTGG  
AAAACTCATATAGAAAATGAGCCTACTGCTATTTGGAACTTTAGGCTAAAAACACAAT  
AATCGGCCCGGCGTACAGCCAATACGCCTTTTACGCGCTCTATTTTTCCCGAATTAAGCG  
CGAAAGAATTGGAAAGCGATGCAAGATGACCAAGAAACCTTCTCCCTTCGACGCGCTC  
TGACTTCGACGAAGCGGCGCTGTTCTTCCATCGCTATCCGAGCGAAGCCAATCTTCTGGT  
ATTCCCGAACCTCGATGCAGCAAACATCACACTTAATGTGGTCAAGGCCGTACGGATGC  
GCTGCATGTTGGCCCAATCTTCTTGGAGCAACCCGTCCGGCCCATATTCTGACGCCTTC  
CGTCACATCGCGCGGTGTCGTCAACATGACGGCGCTGGCCGTGTCGAAGCCTTGCAAAA  
GAACGCCAGCAATCGTCGGCAGAAGTAATTTTAGATTATGCTTTAAAAGCATATTGAAGT  
ATTAGACGAATAAAACGCCGGGTATGACAATGGTTATACTCGGCGTTTACTTTTTATTAA  
AGCCATACGACAATAATCTCACTCACGAACAACGGGGTTGAGGTTTCGTTTTATGGCG

Para la construcción de un mutante en gen *pckA*

Inserto de 539 bp pares de bases con el gen *pckA* mutado

TGTTTTGCAGTTTTCCACACCCCGAAGCGCTCGGGTTAAACGATTTAAAAAATTTCAAAA  
ATTTTAAATCGATTAAATATTTGAATTTTCTCAATTAATCTGTTTCTGACTGCCATCCCC  
CATGAAAGCCAAACCAGGGGGACGCATTTTTTTAGTTAGTCAAACAGACGGCGGAGACATC  
ATGAAAGAGACCGGCATCCACAATAAGGCCGCTTCGATTGACGGCTCGCTGAACAATGCT  
GAATTCGGCATCGATCCGAATTCGGCTTCGCCGCTCCCTGTCGAAGTGCCGGGTGTGGAA  
AGCTCCATTCTCGATCCGCGCTCGACCTGAGCCGACAAAGTTGCCTATGACGCCCAGGCC  
AAGAAGCTGGTCGACATGTTTCGTTTTCCAACCTCGAGAAGTTTGAAGCCACGTCGACCAC  
GAGGTCAAGGATGCCGCACCGGCATCCGCATGGCTGCTGAATAGGTTTTAAGCATATTG  
AGGAGGGGGGAAGCCCGCCATCGCGCCGGGCTTCTTTTTTTGGCTGTTATCGCAAGAA



## **Construcción 7**

Para la construcción de un mutante en gen **aceA**

Inserto de 516 bp pares de bases con el gen **aceA** mutado

```
TGACAAGATATCGCCAAAACACCCCTTTGACAAGATTTACAAATTTACATCCTGTGCGCAG
TCAATTTCCCGACAGCATTACCTCAATTTTATGCCGAAATTCCGCTTTTTCTGGCGCAT
CGGCCCGGGCGATTGTAAATCTGGTCACAGAAAGAGCGCCATTGAGCGACCTTCAAAAA
CCGGATATCACCACGAGGAGACACCGAAATGACAGATTTTTACAGCCTCATCCCTTCGGA
AACCACAGTTCAAGCCGGCTGCCGAGTAGCAGCCGGGACCACCGAACCAGGAGGACCA
GTACCATGAATTCGCCAGCACGCGTCAAGGAAAGAGCAGAAGAACAATCCTCGAGCATGA
ACACGGATCAGCAGACCATCATCCGTATGCTCGCCAACGATCTGCATCGCCTCAACTATA
CCGTATGAAAGCGGTTCGAGGCAGGCGTCTCGGTGGAAGTGGTCCGCTCGGCCCGTCATC
ATGGCGGCGACGGCAACTGGGGTGATCTCTTGATCC
```

Mapa de restricción: el que se deriva de introducir la secuencia en <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

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

### **Se señala el inserto para cada una de las construcciones**

#### **Construcción 1. Para la construcción de un mutante en gen *mae***

El inserto contiene el gen **mae** con una deleción desde el codon 26 al 700, flanqueada por 265 pares de bases por delante del codon de iniciación ("start") y 149 pares de bases por detrás del codon de parada ("stop"). Puesto que este gen tiene una deleción interna no es funcional

#### **Construcción 2. Para la construcción de un mutante en gen *fbp***

El inserto contiene el gen **fbp** con una deleción desde el codon 15 al 326, flanqueada por 161 pares de bases por delante del codon de iniciación ("start") y 148 pares de bases por detrás del codon de parada ("stop"). Puesto que este gen tiene una deleción interna no es funcional

#### **Construcción 3. Para la construcción de un mutante en gen *glpX***

El inserto contiene el gen **glpX** con una deleción desde el codon 21 al 205, flanqueada por 515 pares de bases por delante del codon de iniciación ("start") y 203 pares de bases por detrás del codon de parada ("stop"). Puesto que este gen tiene una deleción interna no es funcional

#### **Construcción 4. Para la construcción de un mutante en genes *fbp* y *glpX***

El inserto contiene el gen **fbp** con una deleción desde el codon 15 al 326, flanqueada por 161 pares de bases por delante del codon de iniciación ("start") y 148 pares de bases por detrás del codon de parada ("stop"), y el gen **glpX** con una deleción desde el codon 21 al 205, flanqueada por 515 pares de bases por delante del codon de iniciación ("start") y 203 pares de bases por detrás del codon de parada ("stop"). Puesto que estos genes tienen una deleción interna no son funcionales.

#### **Construcción 5. Para la construcción de un mutante en genes *pckA* y *ppdK***

El inserto contiene el gen **pckA** con una deleción desde el codon 14 al 454, flanqueada por 180 pares de bases por delante del codon de iniciación ("start") y 208 pares de bases por detrás del codon de parada ("stop"), y el gen **ppdK** con una deleción



desde el codon 35 al 859, flanqueada por 185 pares de bases por delante del codon de iniciación ("start") y 134 pares de bases por detrás del codon de parada ("stop"). Puesto que estos genes tienen una delección interna no son funcionales.

#### **Construcción 6. Para la construcción de un mutante en genes *mae* y *pckA***

El inserto contiene el gen *mae* con una delección desde el codon 14 al 454, flanqueada por 265 pares de bases por delante del codon de iniciación ("start") y 149 pares de bases por detrás del codon de parada ("stop"), y el gen *pckA* con una delección desde el codon 14 al 454, flanqueada por 180 pares de bases por delante del codon de iniciación ("start") y 208 pares de bases por detrás del codon de parada ("stop"). Puesto que estos genes tienen una delección interna no son funcionales.

#### **Construcción 7. Para la construcción de un mutante en gen *aceA***

El inserto contiene el gen *aceA* con una delección desde el codon 11 al 419, flanqueada por 208 pares de bases por delante del codon de iniciación ("start") y 245 pares de bases por detrás del codon de parada ("stop"). Puesto que esta ORF tiene una delección interna no es funcional.

Descripción del método utilizado para la transformación:

#### **Se seguirá el mismo procedimiento para todas las construcciones**

El plásmido derivado de pJQK donde se ha clonado **el gen de interés** mutado se introducirá por transformación en la cepa de *E.coli* S17  $\lambda$ -*pyr* (polimixina (PmB) sensible) y se transferirá a *B. suis* (PmB R, Kanamicina (Km) S) por conjugación. El plásmido derivado de pJQK no puede replicarse en *Brucella* y, por lo tanto, el gen mutado presente en este plásmido se recombinará con la región correspondiente del cromosoma de *Brucella suis* donde se encuentra el gen salvaje. Los exconjugantes donde se produzca la primera recombinación y, por lo tanto, la integración de todo el plásmido suicida en el cromosoma, se seleccionarán sobre placas de TSA con polimixina y kanamicina mantenidas a 37°C.

Para favorecer la segunda recombinación, las bacterias se crecieron a 37 °C, en medio líquido con agitación, pero sin kanamicina. Aquellas en las que se produjo la doble recombinación, se seleccionaron en TSA con polimixina y sacarosa al 5% y se comprobará que se vuelven sensibles a la kanamicina. Para diferenciar los clones en los que la segunda recombinación de lugar a la recuperación del gen salvaje, de aquellos en los que se produzca la sustitución del gen salvaje por el gen mutado, se realizará una PCR con cebadores que flanquean la ORF. En el primer caso (recuperación del gen salvaje) el tamaño esperado del fragmento será mayor que en el segundo (obtención del mutante).

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

#### **Construcción 1**

El gen *mae* con una delección de los codones 26 al 700

#### **Construcción 2**

El gen *fbp* con una delección de los codones 15 al 326

#### **Construcción 3**



El gen **glpX** con una delección de los codones 21 al 205

**Construcción 4**

El gen **fbp** con una delección de los codones 15 al 326 y el gen **glpX** con una delección de los codones 21 al 205

**Construcción 5**

El gen **pckA** con una delección de los codones 14 al 454 y el gen **ppdK** con una delección de los codones 35 al 859

**Construcción 6**

El gen **mae** con una delección de los codones 26 al 700 y el gen **pckA** con una delección de los codones 14 al 454

**Construcción 7**

El gen **aceA** con una delección de los codones 11 al 419

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

No hay

e) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

**Si**

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

**No**

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

**No**





## VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

### 1) Estado y expresión del material genético introducido:

#### Común a todas las construcciones

a) ¿Es un plásmido libre? **NO**

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?

SI.

Al introducir el material genético se produce la sustitución del gen original presente en el cromosoma bacteriano por el gen mutado. Este gen mutado es inactivo.

En caso afirmativo:

i) número de copias: 1

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

iii) secuencias colindantes Las mismas que en el organismo original

iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?: La inserción inactiva únicamente el gen que se quiere mutar. El mutante construido es NO polar y por lo tanto la expresión de otros genes NO se ve alterada.

c) Si se trata de un virus: No procede

i) La inserción es específica

ii) La inserción se produce al azar

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas

d) Análisis moleculares realizados relativos a la expresión del producto deseado (PCR, Northern, secuenciación, otros): PCR con oligonucleótidos específicos que hibridan en ambos extremos del gen de interés

i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

ii) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

iii) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto.

No procede

### 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  
Se estudiará cuando se obtenga el OMG

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



- Se estudiará cuando se obtenga el OMG
- c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar:  
El metabolismo de *Brucella* es un factor clave para su virulencia. Se espera que una mutación en un gen implicado en el metabólico disminuya la virulencia (es decir se espera que la OMG resultante esté más atenuada que la cepa original)
- d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:  
Se estudiará cuando se obtenga el OMG
- e) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese:  
Se estudiará cuando se obtenga el OMG
- f) Marcadores específicos del OMG:  
El OMG no posee ningún marcador específico que lo diferencia de la cepa original

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

El OMG es estable indefinidamente

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

No existe

**5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.**

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.

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

b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente.

No se va a liberar al medio ambiente.



## VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

- a) Enseñanza   
b) Investigación  X  
c) Desarrollo

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

- a) Volumen máximo en el caso de microorganismos:  
Volumen máximo: 5 ml por experimento  
b) Número de plantas:  
c) Número de animales:

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada

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

5 años a partir de junio 2015 prorrogable según resultados

**Financiación: AGL2014-58795-C4-1-R. Ministerio de Economía y Competitividad**

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

Caracterización fenotípica de los OMG obtenidos para realizar estudios sobre el papel del metabolismo en la virulencia de *Brucella* con el objetivo final de desarrollar nuevas vacunas contra la brucelosis.

5) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa (señalar nombre y ubicación), y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG:

Estos OMG son obtenidos en la Universidad de Navarra, que ha solicitado la autorización correspondiente para trabajar con ellos.

6) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo en virtud de la legislación aplicable<sup>1</sup> (tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

<sup>1</sup> Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- 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. El formulario necesario para acompañar a los OMG en el transporte, puede encontrarse en el siguiente enlace: (<http://www.biodiv.org/biosafety/cop-mop/result.aspx?id=8288&lg=1> )
- Normativa nacional e internacional (OACI/IATA, OMI/MDG, TPF/RID y TPD/ADR) para el transporte de mercancías peligrosas y, en particular, de sustancias infecciosas y muestras para diagnóstico.



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

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

Los OMG serán caracterizados mediante pruebas bioquímicas y bacteriológicas estándar (Alton et al. 1988), i.e, pruebas de oxidasa y ureasa, aglutinación con anti-sueros, crecimiento con colorantes, sensibilidad a fagos, requerimiento de CO<sub>2</sub> y sensibilidad a antibióticos. Los subcultivos del OMG se realizarán mediante repicado y extensión con asa de siembra en placas de Petri con medio agar sólido e incubación en estufa (37°C) durante 24-48 h. Las suspensiones bacterianas para la realización de las pruebas bioquímicas y bacteriológicas tendrán un volumen total máximo de 5mL (10<sup>9</sup> UFC/mL). Esta actividad tendrá lugar en el laboratorio P3 del CITA (A/ES/15/I-17).

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

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

Todos los subcultivos, suspensiones bacterianas y pruebas bioquímicas/bacteriológicas con estos OMG se realizarán en el interior de campanas de bioseguridad BIO-II-A (Telstar) situadas dentro del **Laboratorio de Microbiología** con nivel de contención 3 del Edificio I+D del CITA. Esta instalación ha sido autorizada para la manipulación de OMG hasta tipo 3 (**A/ES/15/I-17**). Este laboratorio tiene acceso restringido (mediante carteles indicativos), se encuentra en depresión respecto a las zonas contiguas y dispone de filtros HEPA absolutos para filtrar el aire que sale al exterior. La manipulación del OMG será siempre realizada por personal especializado y entrenado para el trabajo con este tipo de microorganismos, provisto de los EPI adecuados (guantes de nitrilo, bata, gorro y calzas desechables). Todo el material contaminado será inactivado en un autoclave situado dentro del laboratorio e introducido en cubos de cierre hermético para su posterior eliminación por la empresa gestora autorizada. Las aguas serán tratadas antes de su vertido final al colector general.

### **VIII.- INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN**

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

No hay ninguna fuente de peligro potencial en la proximidad

- 2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

El **Laboratorio de Microbiología P3** se mantiene a temperatura 22- 24 °C, controlada por un sistema automático de climatización que es revisado diariamente por el personal de mantenimiento.

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

**Laboratorio de Microbiología** con nivel de contención 3 del Edificio I+D del CITA (**A/ES/15/I-17**).



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

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

Existen protocolos para todos los procedimientos y manuales de bioseguridad.

### 2) Formación del personal adscrito:

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

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

Limpieza de las cabinas de seguridad biológica, tras su uso, con propanol (Propano AF -Esteer-Pharma-) seguida de irradiación con UV. Para superficies también se utiliza propanol. La salida de materiales y residuos se realiza a través de Autoclave o SAS.

Existe la posibilidad de descontaminación ambiental por nebulización con formol-amoniaco de las salas y equipos utilizados.

### 4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

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

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

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

### 5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Inspecciones por la autoridad competente del Gobierno de Aragón.

## **X.- GESTIÓN E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS**

### 1) Encargado de la gestión de residuos:

Gestión interna:	SÍ	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
Gestión por una empresa externa:	SÍ	X	NO	<input type="checkbox"/>



Si es el caso, nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:

SRCL Consenur

2) Inactivación de residuos: método, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados

Los residuos biológicos generados durante manipulación de los OMG son inactivados con propanol o autoclavados e introducidos en cubos de cierre hermético junto con el material fungible contaminado, para su gestión y eliminación a través de la empresa de gestión de residuos autorizada (los cubos son proporcionados por dicha empresa). El material punzante es introducido en cubos específicos gestionados por la misma empresa. **El laboratorio P3** dispone de sistema tratamiento de aguas antes del vertido final al colector general.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

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

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Acceso restringido al personal autorizado en todas las instalaciones mediante carteles indicativos y puertas de acceso bajo llave.

El personal dispone de los EPI adecuados y ropa de uso desechable (monos, pijamas, batas, calzado, guantes, mascarillas y gafas de protección).

El **Laboratorio de Microbiología P3** dispone de cabinas de seguridad biológica (BIO-II A – Telstar-) y se encuentra en depresión respecto a las zonas contiguas; existe ventilación de entrada y salida con filtros HEPA absolutos; se dispone de autoclaves y SAS. Hay ventana para la visualización del interior del laboratorio y teléfono conectado con el exterior. Se dispone de instalación contra incendios con un mantenimiento contratado, fuentes lavaojos, duchas de seguridad y botiquines de primeros auxilios.

El material contaminado es inactivado mediante el uso de autoclaves o baño con propanol.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

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

4) Planes de emergencia:



Ante accidentes derivados de la actividad se tomarán las siguientes medidas

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

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

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

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

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

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

e) En el caso de accidente físico:

- Exposición ocular a aerosoles o salpicaduras:

Lavar al menos 15 minutos con agua.

Acudir al hospital para evaluación y tratamiento.

- Exposición a agujas o material punzante.

Lavar cuidadosamente la zona herida con agua corriente sin restregar

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

Desinfectar la herida con povidona yodada (u otro desinfectante)

Cubrir la herida con un apósito impermeable

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

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



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

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
-----------------	---------------------

**Cumplimentar un formulario tipo C por cada actividad tipo 2, 3 o 4. En caso de actividades tipo 1, deben seguirse las instrucciones recogidas en el apartado III.1.a de la Guía para la remisión de solicitudes de registro de instalaciones.**

**RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD**

a) Entidad

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

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Antonio Domínguez Andreu  
NIF: 17978650-X  
Cargo: Director Gerente  
Tel: 976 71 65 50  
Fax: 976 71 63 35  
Correo electrónico: direccion.cita@aragon.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Pilar María Muñoz Álvaro  
NIF: 08917172A  
Cargo: Doctora Investigadora  
Tel: 976 71 3799  
Correo electrónico: pmmunoz@cita-aragon.es

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

Nombre y apellidos: José Antonio Domínguez Andreu  
NIF: 17978650-X  
Cargo: Director Gerente  
Tel: 976 71 65 50  
Fax: 976 71 63 35  
Correo electrónico: direccion.cita@aragon.es

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

Pilar María Muñoz Álvaro





## II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

### 1. Objetivo de la actividad:

Caracterización de cepas candidatas a vacunas frente a la brucelosis

### 2. Duración prevista de la actividad:

3 años (2015-2018)

## III. EVALUACIÓN DE RIESGO

Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en el Anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo.

### 1. Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del: Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

#### a) Organismo receptor.

Bacteria: *Brucella suis*

Taxonomía: Familia Brucellaceae; Género *Brucella*

Nombre común: *B. suis*

#### b) Organismo donante.

*Brucella suis*

#### c) Inserto.

El inserto contiene el gen presuntamente implicado en el metabolismo de *Brucella* con una delección de la región central (ver Parte A confidencial correspondiente).

#### d) Vector.

Plásmido derivado del vector pJQK (ver más adelante en la sección tipo de vector empleado en el proceso de modificación). (Gene 1997 (202): 53-59)

#### e) Organismo modificado genéticamente resultante.

1. *B. suis* mutante en gen *mae*
2. *B. suis* mutante en gen *fbp*
3. *B. suis* mutante en gen *glpX*
4. *B. suis* mutante en genes *fbp* y *glpX*
5. *B. suis* mutante en genes *pckA* y *ppdK*
6. *B. suis* mutante en genes *mae* y *pckA*
7. *B. suis* mutante en gen *aceA*

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

Como máximo, los mismos que los originados por la cepa receptora



g) Efectos para el medio ambiente.

*Brucella suis* no se multiplica fuera de sus huéspedes o de las condiciones de cultivo. Sí es capaz de sobrevivir en el ambiente en determinadas condiciones, pero no de forma indefinida.

2. Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 4 de la Directiva 2009/41/CE y, en caso de ser aplicable, otros sistemas de clasificación nacionales e internacionales existentes (por ejemplo, la Directiva 2000/54/CE sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo).

Tipo 3            x

3. Probabilidad de que se produzcan efectos nocivos y gravedad de los mismos, en función de: Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

a) Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental).

No es previsible que el OMG objeto de estudio produzca efectos nocivos en la salud humana o animal, ni sobre el medio ambiente, dadas las condiciones de manipulación del mismo y las condiciones de confinamiento a las que es sometido en las instalaciones del CITA (ver punto 4).

b) Concentración y escala utilizadas.

La concentración máxima de bacteria a manipular será de  $10^9$  UFC/mL en un volumen máximo de 5mL.

c) Condiciones de cultivo (se tendrá en cuenta el entorno potencialmente expuesto, la presencia de especies susceptibles, supervivencia del OMG y efectos sobre el entorno físico).

La cepa parental (organismo receptor) de este OMG es *Brucella suis*, una especie del género *Brucellae* que afecta de forma natural a suidos (principalmente jabalí y cerdo doméstico), causando abortos, lesiones testiculares y problemas de fertilidad. En humanos produce una enfermedad que cursa normalmente con cuadros febriles, debilidad, artromialgia y fibromialgia. La biovariedad 5 de *B. suis* se aisló a partir de roedores silvestres.

El subcultivo de este OMG y la preparación de suspensiones bacterianas y su caracterización mediante pruebas bioquímicas y bacteriológicas se realizará en el interior de cabinas de seguridad biológica, que a su vez se encuentran en un laboratorio con nivel de contención 3 previamente autorizado para trabajar con OMG tipo 3 (**AVES/15/I-17**). Esta instalación tiene acceso restringido y disponen de sistema de ventilación controlada a través de filtros HEPA absolutos. Se respetarán las medidas preventivas recomendadas para la manipulación de microorganismos potencialmente patógenos. El almacenamiento y transporte de los productos conteniendo el OMG se hará en recipientes herméticos y respetando las medidas de confinamiento. Por todo ello, no es previsible que los cultivos de OMG produzcan efectos nocivos en el entorno físico ni en otras especies susceptibles.



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

El OMG objeto de estudio se obtiene a partir de una cepa parental de *Brucella suis*, especie declarada como agente biológico de tipo 3 según R.D. 664/97, de 12 de mayo sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. Para la obtención del OMG, se realiza una delección en genes relacionados con la virulencia de la bacteria, por lo que el resultado esperado es una cepa de virulencia atenuada respecto a su parental. En caso de no lograrse la atenuación esperada, los efectos del OMG serían, como máximo, los mismos que los de la cepa parental.

Tanto los subcultivos como las suspensiones del OMG se manipularán en el interior de cabinas de seguridad biológica (BIO-IIA, Telstar) situadas dentro del **Laboratorio de Microbiología** con nivel de contención 3 del Edificio I+D del CITA, previamente autorizado para trabajar con OMG tipo 3 (**AVES/15/I-17**). Esta instalación tiene acceso restringido (mediante varias puertas cerradas y carteles indicativos) y dispone de filtros HEPA absolutos para filtrar el aire que sale al exterior.

La manipulación del OMG será siempre realizada por personal especializado y entrenado para el trabajo con este tipo de microorganismos, provisto de los EPI adecuados (guantes de nitrilo, bata, gorro y calzas desechables, mascarillas FFP3).

Todo el material contaminado será inactivado en autoclaves *in situ* y/o introducido en cubos de cierre hermético para su posterior eliminación por una empresa gestora autorizada. Las aguas del **Laboratorio P3** serán tratadas antes de su vertido final al colector general.

El OMG se almacenará y transportará en sistemas herméticamente cerrados y aislados del entorno.

5. Determinación del riesgo en el caso de que se produzca una liberación accidental:  
Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

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

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

El **Laboratorio de Microbiología** de contención de nivel 3 (**AVES/15/I-17**) en el que se manipularán los OMG está localizado en el edificio I+D del campus del CITA, en una área suburbana. Este laboratorio dispone de sistemas automáticos de climatización (22-25°C), está dotado de sistema de presión negativa y eliminación de aire con control microbiológico mediante filtros HEPA del 99,9%.

Las posibilidades de una liberación accidental en las instalaciones descritas son mínimas debido a los equipos y sistemas de aislamiento empleados para la manipulación de los OMG y a los protocolos establecidos para la eliminación de los residuos, que son inactivados (por autoclavado, baño con propanol o tratamiento de aguas residuales) y/o eliminados por la empresa gestora autorizada para el tratamiento de residuos biológicos.



b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

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

c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales (ver Partes B correspondientes)

- Cultivo del OMG, preparación de suspensiones bacterianas y realización de pruebas bioquímicas y bacteriológicas en el interior de cabinas de seguridad biológica en el **Laboratorio de Microbiología** del CITA (**A/ES/15/I-17**).
- El centro tiene asignado personal de mantenimiento adecuadamente formado para la vigilancia y control de las medidas de confinamiento y condiciones de climatización. Además, se dispone de termómetros visibles para el control de la temperatura por parte de los usuarios y manómetros para vigilar la presión de las salas sometidas a depresión y el adecuado funcionamiento de los filtros HEPA que filtran el aire de estas instalaciones antes de su salida al exterior.
- Se realiza la desinfección con autoclave disponible *in situ* o propanol de todo el material (sólido o líquido). Además, hay posibilidad de descontaminar las salas por nebulización con equipo portátil de formol-amoniaco si se considerase necesario.
- El personal dispone de los EPI adecuados (guantes, batas, calzas y gorros desechables, mascarar o mascarillas FFP3), ducha lavavojos, botiquín de primeros auxilios y fármacos.
- El laboratorio dispone de una ventana de observación para ver a sus ocupantes y de teléfono para mantener comunicación con el exterior.
- Los microorganismos viables se almacenan en un sistema cerrado aislados del entorno. El almacenamiento es cerrado y señalizado con el pictograma de riesgo biológico. Las neveras y congeladores donde se almacenan los OMG disponen de sondas de temperatura con sistema de alarma automatizado en caso de producirse una avería.



d) Planes de emergencia (para actividades tipo 3 y 4).

El Plan de Actuación ante Emergencias del laboratorio P3 se integra en el Plan de Autoprotección del Edificio I+D, del cual forma parte. Este edificio es de uso compartido entre el CITA y el Departamento de Desarrollo Rural y Sostenibilidad del Gobierno de Aragón. En la recepción del edificio se encuentra el protocolo de actuación en caso de emergencia, el listado de las personas responsables en caso de emergencia, los formularios para el control de la evacuación del edificio y los números telefónicos útiles en caso de emergencia.

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

a) En caso de rotura de viales o jeringas:

Cubrir los derrames con exceso de producto desinfectante (propanol), dejar actuar durante 30 minutos antes de limpiar con papel absorbente y desechar los residuos en cubo con cierre hermético (proporcionado por la empresa autorizada para la gestión de residuos biológicos).

b) En el caso de accidente físico:

- Exposición ocular a aerosoles o salpicaduras:

Lavar al menos 15 minutos con agua.

Acudir al hospital para evaluación y tratamiento.

- Exposición a agujas o material punzante.

Lavar cuidadosamente la zona herida con agua corriente sin restregar

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

Desinfectar la herida con povidona yodada (u otro desinfectante)

Cubrir la herida con un apósito impermeable

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

En caso de producirse una infección se tratará al paciente con rifampicina (15 días) combinada con doxiciclina (45 días).