



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

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

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: [Centro Nacional de Biotecnología \(CSIC\)](#)
Dirección postal: [c/ Darwin 3](#)
[28049 - Madrid](#)

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: [Fernando Rojo de Castro](#)
NIF: [50295113-R](#)
Cargo: [Director del CNB](#)
Tel: [91 585 45 03](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: direccion.cnb.csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: [Jesús Blázquez Gómez](#)
NIF: [51632306 C](#)
Cargo: [Profesor de Investigación del CSIC](#)
Tel: [91 585 5433-34](#)
Fax:
Correo electrónico: blazquez@cnb.csic.es

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

Nombre y apellidos: [Fernando Usera Mena](#)
NIF: [00694865-N](#)
Cargo: [Responsable del Servicio de Seguridad Biológica y Protección Radiológica](#)
Tel: [91 585 45 41](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es



e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto
[Fernando Usera Mena](#)

- 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: [7/03/2001](#)

b) Número de referencia del expediente: [A/ES\(00/I-8\)](#)

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Finalidad de la actividad:

Construir un mutante de delección de *nucS* (MT_1321) a partir de las cepas silvestres H37Rv y CDC1551 de *M. tuberculosis*. La modificación genética a realizar consiste en la generación de un mutante de delección en fase del gen *nucS* (MT_1321) de *M. tuberculosis*, a partir de las cepas silvestres H37Rv y CDC1551 de *M. tuberculosis*. La estrategia a seguir consiste en la eletroporación de un plásmido que contiene la delección del gen, para su integración en el genoma de ambas bacterias, y de esta forma mediante una doble recombinación generar el organismo modificado genéticamente carente del gen *nucS* en fase. Se va a realizar la delección partiendo de ambas estirpes parentales silvestres, puesto que la estirpe H37Rv y la CDC1551 difieren en un polimorfismo puntual en este gen diana *nucS*, por lo que es necesario evaluar el efecto de la delección sobre ambos fondos genéticos. Por tanto, el mismo proceso de modificación genética se realizará en paralelo empleando la misma construcción y el mismo procedimiento, pero partiendo de diferentes estirpes parentales. En ambos casos, el organismo modificado genéticamente resultante contendrá una delección en fase del gen *nucS*, sin ningún tipo de marcador de resistencia a antibiótico en su genoma ni efectos polares sobre otros genes.

Una vez obtenido este OMG, el objetivo principal de este proyecto es determinar la tasa de mutación de las cepas silvestres de *M. tuberculosis* (H37Rv y CDC1551), así como de sus derivados carentes del gen *nucS*. Estudios previos realizados con NucS de *Mycobacterium smegmatis* han revelado que esta proteína es un componente de reparación del ADN clave para mantener la estabilidad genómica en micobacterias. Este componente es esencial para evitar la adquisición y fijación de mutaciones espontáneas en el genoma de estos organismos y, por tanto, ejerce un papel muy importante en el control de la tasa de mutación. Por ello, para evaluar el papel de NucS en *M. tuberculosis* en relación con su posible impacto en el proceso de reparación del ADN, es necesario llevar a cabo experimentos de fluctuación y conocer las tasas de mutación de las cepas silvestres y el mutante *nucS* frente a diferentes antibióticos.

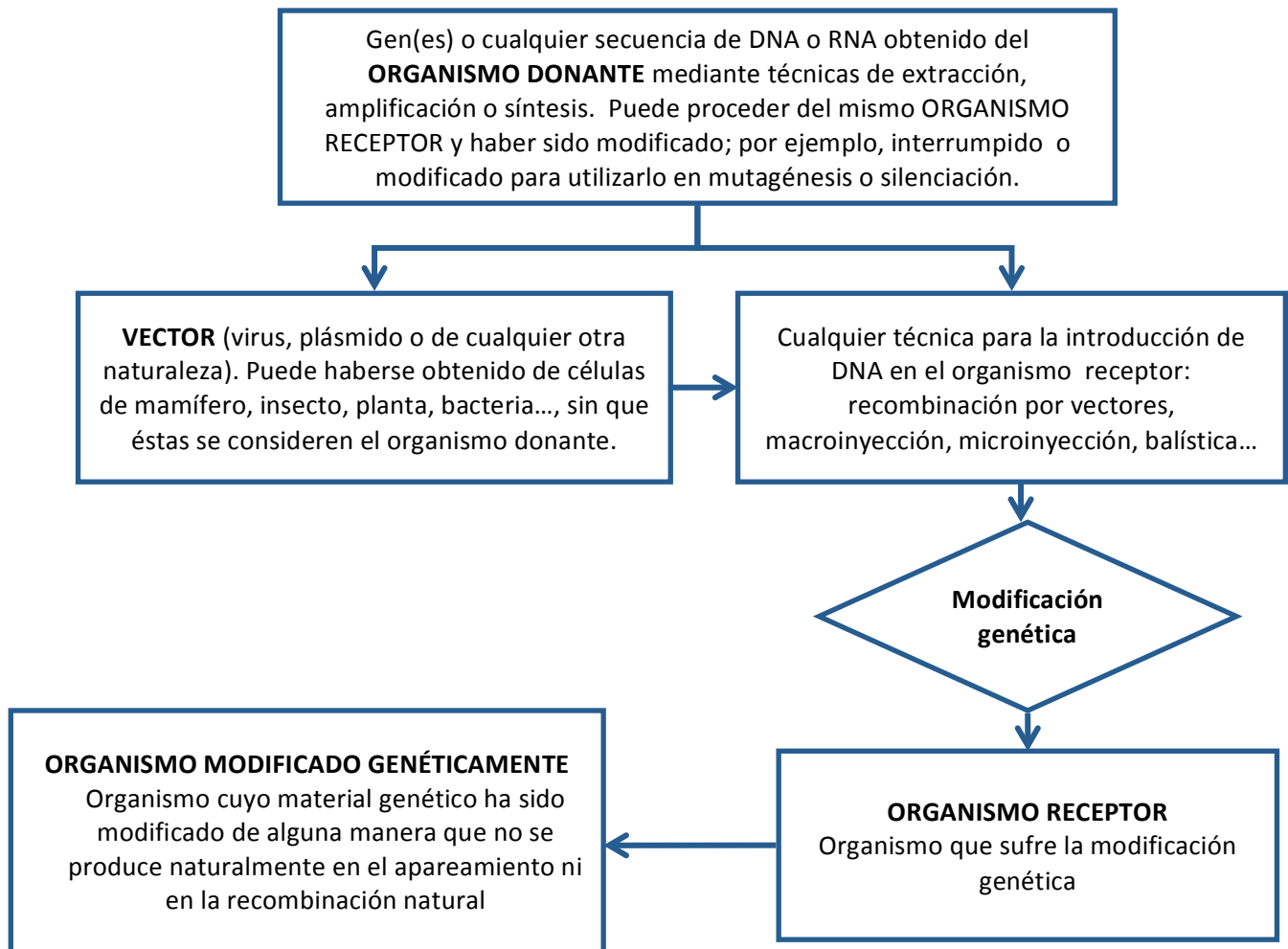


2) Clasificación de la actividad

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

- Tipo 1
- Tipo 2
- Tipo 3
- Tipo 4

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





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

1) Nombre científico: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y CDC1551
Taxonomía: Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteria; Corynebacteriales; Mycobacteriaceae; *Mycobacterium*; *Mycobacterium tuberculosis* complex
Nombre común: Estirpes silvestres de *Mycobacterium tuberculosis*

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

Cultivo en medios líquidos y sólidos. Se emplea medios específicos de micobacterias, medio líquido Middlebrook 7H9 y medio sólido Middlebrook 7H10, ambos enriquecidos con OADC (oleico albumina dextrosa catalasa).

b) Técnicas de identificación:

Técnicas clásicas de tinción (ácido alcohol resistencia). Identificación por PCR.

c) Marcadores genéticos:

d) Marcadores fenotípicos:

e) Estabilidad genética:

Es un organismo genéticamente muy estable. Presenta una baja variabilidad genética entre cepas.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores

No tiene

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:

Se trata de una bacteria patógena principalmente para humanos, pero también para algunos animales. Solo es infeccioso en su forma viva.

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.):

Grupo de riesgo 3

a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?



Es una patología respiratoria, con deterioro de las funciones pulmonares debido a la formación de lesiones denominadas tubérculos. Se manifiesta con síntomas respiratorios, como tos y dificultad al respirar, febrícula, malestar general y cansancio.

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

SI NO

Por qué:

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

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

Es un organismo de referencia empleado de forma común y segura en todos los laboratorios de investigación en tuberculosis.

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?:

Sí. La vida media calculada de *M. tuberculosis* fuera del huésped es variable dependiendo del estudio, desde 20 min a 6 h según el estudio. Es muy sensible a la luz del sol con una vida media de 2-10 min.

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"/> |

No genera formas de resistencia

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

Es un organismo bastante resistente a los factores medioambientales y sensible a UV.

d) Posibles nichos ecológicos:

Sobrevive en aerosoles o en material contaminado con la bacteria de forma prolongada.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

Es un organismo de crecimiento muy lento, su tiempo de generación en laboratorio es de 15-24 horas. No tiene apenas capacidad para dividirse y proliferar en ecosistemas naturales.



- 10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:
- a) Implicaciones en procesos ambientales (p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo):
No
 - b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:
Produce tuberculosis animal
- 11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:
Es un organismo ubicuo a nivel mundial. 1/3 de toda la población mundial esta infectada o ha estado en contacto con este patógeno.
- 12) Hábitat natural del organismo:
Es un patógeno, normalmente se reproduce y crece en el hospedador humano, y se transmite entre individuos mediante aerosoles. En el medio ambiente, es capaz de sobrevivir y es infeccioso, pero apenas es capaz de crecer y dividirse.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

No procede. No hay organismo donante. La modificación genética es una delección de un gen dentro del propio organismo receptor. No se introduce ADN de ningún organismo donante.

- 1) Nombre científico: No aplica
Taxonomía: No aplica
Nombre común: No aplica
- 2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:
No aplica
- 3) Método de obtención:
- a) Extracción
 - b) PCR
 - c) Síntesis *in vitro*
- 4) Función del gen/genes en el organismo donante:
No aplica
- 5) ¿Es patógeno o nocivo de cualquier otra forma (incluidos sus productos extracelulares) el organismo donante, vivo o muerto?
No aplica
- SI NO
- a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:
 - i) seres humanos
 - ii) animales
 - iii) plantas



b) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

No aplica

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

No aplica.

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

No aplica.

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| a) Inserción de material genético | <input type="checkbox"/> |
| b) Deleción de material genético | <input checked="" type="checkbox"/> |
| c) Sustitución de bases | <input type="checkbox"/> |
| d) Fusión celular | <input type="checkbox"/> |
| e) Otros, especifíquese | |

2) Finalidad de la modificación genética:

Construir un mutante de deleción de *nucS* (MT_1321) a partir de las cepa silvestres H37Rv y CDC1551 de *M. tuberculosis*. El proyecto consiste en la generación de un mutante de deleción en fase del gen *nucS* (MT_1321) de *M. tuberculosis*, a partir de la cepas silvestres H37Rv y CDC1551 de *M. tuberculosis*. La estrategia a seguir consiste en la eletroporación de un plásmido que contiene la deleción del gen, para su integración en el genoma de ambas bacterias, y de esta forma mediante una doble recombinación generar el organismo modificado genéticamente carente del gen *nucS* en fase. Se va a realizar la deleción partiendo de ambas estirpes parentales silvestres, puesto que la estirpe H37Rv y la CDC1551 difieren en un polimorfismo puntual en este gen diana *nucS*, por lo que es necesario evaluar el efecto de la deleción sobre ambos fondos genéticos. Por tanto, el mismo proceso de modificación genética se realizara en paralelo empleando la misma construcción y el mismo procedimiento, pero partiendo de diferentes estirpes parentales. En ambos casos, el organismo modificado genéticamente resultante contendrá una deleción en fase del gen *nucS*, sin ningún tipo de marcador de resistencia a antibiótico en su genoma ni efectos polares sobre otros genes.

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

El protocolo completo de manipulación genética de *M. tuberculosis* sigue el procedimiento descrito de forma detallada en los capítulos “Electroporation of mycobacteria” and “Construction of targeted mycobacterial mutants by homologous recombination” del libro “Mycobacteria protocols” de Tanya Parish , publicado por Humana Press. Se trata del procedimiento estándar para llevar a cabo cualquier manipulación genética en *M. tuberculosis*. Igualmente se siguen todas las recomendaciones de bioseguridad indicadas en los protocolos contenidos en ellos. A continuación se detallan estos protocolos, con las leves modificaciones introducidas:

-Crecimiento y procesamiento de las células silvestres de *M. tuberculosis* para su modificación genética.



Este protocolo permite obtener células de la cepa parental de *M. tuberculosis* listas para ser transformadas.

1. Se inoculan la cepa silvestre de *M. tuberculosis* (H37Rv o CDC1551) en 10 ml de medio líquido 7H9 con OADC en un matraz de polipropileno estéril de 250 ml de volumen total. Se incuba en el incubador a 37°C durante 10-15 días sin agitación. Se mantiene dentro de un recipiente de contención biológica para evitar problemas de bioseguridad.
2. Se inoculan 100 ml de medio líquido 7H9 con OADC en un matraz de polipropileno estéril con 1-10 ml del cultivo de partida de la cepa silvestre. Se incuba en el incubador a 37°C durante 5-7 días sin agitación. Se mantiene dentro de un recipiente de contención biológica para evitar problemas de bioseguridad.
3. Se añade 10 ml de 2M glicina un día antes de procesar las células.
4. Se recogen las células mediante centrifugación a 3.000 g durante 10 min a T ambiente.
5. Se lavan las células con 10 ml de glicerol al 10% previamente incubado previamente a 37°C.
6. Se repite el lavado con 5 ml de glicerol al 10% previamente incubado previamente a 37°C.
7. Se resuspenden las células en 1 ml de glicerol al 10% generando una suspensión de células listas para ser transformadas mediante electroporación.

-Electroporación de *M. tuberculosis* (H37Rv y CDC1551) con el plásmido p2NIL portador de la delección *nucS*

Este protocolo detalla la transformación de las células de *M. tuberculosis* y la obtención de transformantes por un evento de SCO (single-cross over), es decir por recombinación sencilla.

1. Se añaden 5 ug de ADN del plásmido p2NIL con la delección *nucS* a 0.2 ml de células concentradas de la estirpe silvestre previamente preparadas (ver protocolo anterior) y se incuban 10 min a T ambiente . Se realizan un total de 5 replicas, para maximizar la eficiencia de transformación.
2. Se electropora la muestra a 2500 V, 25 uF, 100 ohmios en una cubeta de electroporación de 2 mm (Biorad) con un electroporador Biorad X-Pulser.
3. Se recuperan las células inmediatamente tras añadir añade 10 ml de medio líquido 7H9 + OADC a la muestra en un tubo Falcon de polipropileno estéril de 50ml. Se incuba 1 día a 37°C sin agitación, dentro de un recipiente de contención biológica en el incubador.
4. Se centrifugan las células a 3.000 g durante 10 min y se resuspenden en 1 ml de medio líquido 7H9 + OADC.
5. Se plaquean las células en placas Petri de plástico, que contienen medio sólido 7H10 + OADC, suplementadas con antibiótico higromicina a 50 ug/ml). Por cada muestra, se plaquean 0.9 ml en una placa y 0.1 ml en otra placa (en total 2 placas Petri por cada electroporación).
6. Las placas sembradas se incuban a 37°C en un incubador durante 3-4 semanas hasta la aparición de colonias transformadas. Para ello, las placas se sellan con parafilm por el borde, para evitar su apertura, y además se introducen en bolsas de placas Petri apiladas y cerradas, y se colocan dentro de un recipiente de contención biológica dentro del incubador.

-Selección y detección de la cepa mutante de delección de *nucS*

Este protocolo detalla el proceso de doble recombinación para que ocurra un segundo evento de recombinación, y su posterior contraselección, para de esta forma obtener el mutante de delección en fase para nuestro gen diana.

1. Se pican dos colonias de transformantes generados en las placas de medio sólido, para que crezcan en 5 ml de medio líquido 7H9 + OADC en un tubo Falcon de polipropileno estéril, en ausencia de antibióticos. Se incuban a 37°C sin agitación en un incubador, dentro de un recipiente de contención biológica durante 2 semanas.



2. Los cultivos se plaquean en diluciones seriadas decimales (0, -1, -2, -3 y -4) en un volumen de 1 ml sobre placas Petri estériles con medio sólido 7H10 + OADC, suplementadas con sacarosa al 2-5% y X-gal (100 ug/ml). Por tanto, se generan 5 placas sembradas por cada cultivo, en total 10 placas.
3. Las placas sembradas se incuban a 37°C en un incubador durante 3-4 semanas hasta la aparición de colonias portadoras de la delección del gen *nucS*. Para ello, las placas se sellan con parafilm por el borde, para evitar su apertura, y además se introducen en bolsas de placas Petri apiladas y cerradas, y se colocan dentro de un recipiente de contención biológica dentro del incubador.
4. Finalmente, las colonias resultantes se analizan mediante PCR para comprobar la delección del gen *nucS*. Para ello, se pica cada colonia candidata y se realiza una suspensión en 100 ul de agua estéril en un tubo eppendorf. Las muestras se hierven a 100°C en un baño , se centrifugan a 12.000 g por 10 min y se recupera el sobrenadante. 1 ul de este sobrenadante se emplea como molde en la reacción de PCR. Para verificar la bioseguridad de esta muestra, se plaquea este hervido en placas Petri con medio sólido 7H10 +OADC, y se comprueba la ausencia de crecimiento tras incubar las placas por 4 semanas a 37°C .

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

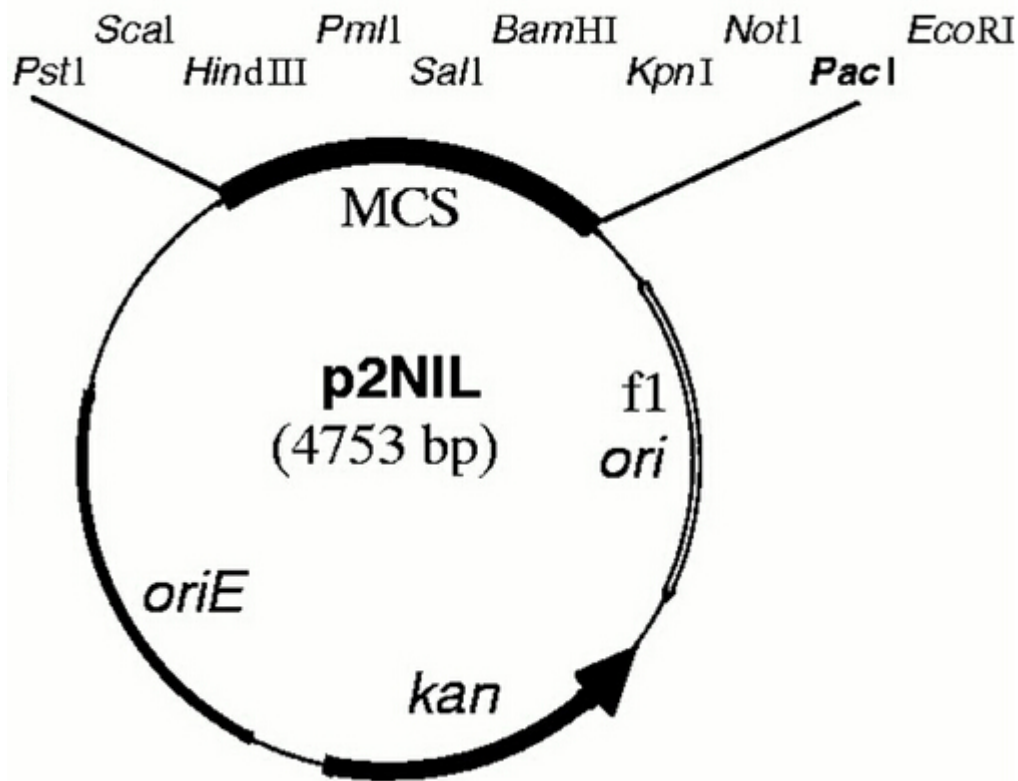
a. Tipo e identidad del vector:

El vector es p2NIL. Se trata de un vector plasmídico que se integra de forma suicida en el genoma de *M. tuberculosis* mediante recombinación

b. Si se trata de un virus:

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):



d. Gama de hospedadores del vector:

Es un vector replicativo en *Escherichia coli* y se integra mediante recombinación en *Mycobacterium tuberculosis*

e. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No hay factores de movilización. Es un vector suicida en micobacterias, una vez que se integra no se moviliza.

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

No es un bacteriófago

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

No

5) Información del inserto:

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

El inserto es un fragmento de 3 kb que contiene la región situada aguas arriba y aguas abajo del gen *nucS* (Rv1321) de *M. tuberculosis*, pero que carece de la secuencia de este gen. Ver secuencias adjuntas en el documento.



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

Generan regiones de homología que permiten la integración de este vector en *M. tuberculosis* mediante recombinación. El inserto carece totalmente del gen diana, *nucS*, puesto que la finalidad es producir una delección de este gen en *M. tuberculosis* mediante una doble recombinación, empleando para ello los fragmentos homólogos situados por encima y por debajo del gen.

El gen diana a delecionar es *nucS* (MT_1321). Este gen codifica una proteína de reparación del ADN de tipo nucleasa, denominada NucS. Esta proteína de reparación presenta homólogos en archaeas que han sido previamente caracterizado a nivel bioquímico. En concreto, esta proteína presenta un dominio N-terminal de unión a DNA y un dominio C-terminal de tipo RecB nucleasa que actúa como nucleasa. Reconoce estructuras de tipo mismatch, emparejamientos erróneos en el ADN, mediando específicamente un corte de doble cadena, y por tanto generando extremos protuberantes de 5 nucleótidos. Se ha postulado que este procesamiento de los emparejamientos erróneos promovería la corrección/reparación de mutaciones en el ADN, actuando como un novedoso sistema de mismatch repair alternativo, una vez que micobacterias carecen del sistema de mismatch repair clásico, basado en MutS/MutL.

La secuencia del gen diana, *nucS* (Rv1321) están disponibles en el documento adjunto.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Electroporación (ver protocolo descrito anteriormente)

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

No hay otros genes estructurales de *M. tuberculosis*.

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

Incluye la región promotora del gen *nucS*

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Si

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

No

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

No

VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?



No en *M. tuberculosis*. El vector se integra en el cromosoma de esta bacteria de forma estable mediante recombinación.

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?

Sí

En caso afirmativo:

i) número de copias:

Una

ii) localización cromosómica:

Localizado en el gen *Rv1321*. Se integra mediante recombinación homóloga en el gen diana a delecionar

iii) secuencias colindantes

No se han modificado

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

Inactiva la expresión del gen *nucS*, *Rv1321*

c) Si se trata de un virus:

No

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):

Se ha comprobado la inserción por PCR. No hay expresión de ningún producto.

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.

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 espera que el OMG tenga una capacidad de supervivencia similar o menor a la estirpe silvestre, ya que no puede reparar ciertos errores en su ADN



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

Se espera que el OMG tenga una tasa de reproducción similar o menor a la estirpe silvestre. La misma modificación genética en *Mycobacterium smegmatis*, un organismo no patógeno, no presenta diferencias de crecimiento in vitro respecto a la cepa parental.

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

Se espera que el OMG tenga una patogenicidad similar o menor a la estirpe silvestre. En principio, esta modificación genética no implica cambios potenciales en virulencia o patogenicidad respecto a la estirpe parental silvestre, si se tienen en cuenta los estudios precedentes en bacterias patógenas carentes de sistemas de reparación de emparejamiento erróneos. En todo caso, esta cepa podría estar atenuada en modelos in vivo, debido a la creciente acumulación de errores en su genoma.

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

Se espera que no.

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

Se espera que no.

- f) Marcadores específicos del OMG:

No contiene ningún gen de resistencia a antibióticos. La delección del gen se realiza en fase, con lo que la única diferencia con la estirpe wild-type es la carencia del gen *nucS*. Durante el proceso de delección, se pierde todo el plásmido empleado en llevar a cabo la delección, careciendo por tanto de marcadores específicos.

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

El inserto es estable genéticamente

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

M. tuberculosis es un organismo considerado genéticamente aislado, con poca o nula transferencia de material genético entre sus estirpes y a otros organismos.

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

- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG :

PCR

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

El OMG se utilizará exclusivamente en el laboratorio NCB3, por lo que no habrá liberación al medio ambiente.



VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

- a) Enseñanza
b) Investigación
c) Desarrollo

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

a) Volumen máximo en el caso de microorganismos:
Cultivos de 5 ml de OMG en laboratorio.

b) Número de plantas: No aplica

c) Número de animales: No aplica

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada

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

4 años

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

Generar un mutante de delección y determinar su tasa de mutación a diferentes antibióticos. Determinar su supervivencia y fitness en condiciones de laboratorio y bajo diferentes condiciones de estrés (UV, desecación, calor, etc.). Se espera una disminución de fitness bajo estrés. Se pretende estudiar la posibilidad de usar el producto del gen NucS como diana de nuevas moléculas antituberculosas.

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:

El OMG se generará en el laboratorio NBC3.

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 aplicable¹ (tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

El OMG va a ser generado en el laboratorio NCB3.

En el caso de que se destine a otras instalaciones, el manejo, embalaje y etiquetado seguirá la normativa internacional y nacional vigente para el transporte de mercancías peligrosas y de sustancias infecciosas.

¹ 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>)



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):

El manejo de células vivas de *M. tuberculosis* se realizará en un grado 3 de confinamiento y tendrá lugar en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica nº150.

El protocolo de estimación de la tasa de mutación se realiza mediante un test de fluctuación de Luria y Delbruck. Para este protocolo el volumen máximo de cultivo es de 5 ml en cada caso, mientras que el número de cultivos generados es de 10 cultivos por cada cepa. Los cultivos van a ser crecidos hasta alcanzar una densidad celular de 10^9 células/ml. Igualmente, se requiere plaquear cada cultivo en 1 placa con medio sólido suplementada con y sin antibiótico (en total 20 placas por cada cepa). Para facilitar el manejo de estos cultivos evitando cualquier riesgo de bioseguridad, se va a dividir todo el trabajo en dos series de experimentos, en uno de ellos se analizará la tasa de mutación de H37Rv y su correspondiente mutante *nucS* y a continuación, una vez completado este experimento, se evaluará la tasa de mutación de CDC1551 y su correspondiente mutante *nucS*.

Los cultivos líquidos se llevarán a cabo en medio líquido 7H9 +OADC (Difco) en tubos Falcon de 50 ml de capacidad, cerrados con tapón de rosca. La inoculación de los cultivos líquidos se realiza con asas desechables (a partir de cultivos de medio sólido) o mediante la transferencia de 5 ul de cultivo (a partir de precultivos de medio líquido). Los cultivos se sitúan en cajas de bioseguridad y serán incubados en la estufa.

Los cultivos sólidos se realizarán en medio sólido 7H10 + OADC (Difco) en placas Petri de 9 cm, previamente secadas para evitar el agua de condensación. La siembra de los medios sólidos se realizará incorporando 0,5 ml de cultivo líquido (concentración máxima de 10^9 células/ml) y extendiéndolas en la placa con una espátula de Driglaski desechable. Las placas se sellan individualmente con parafilm antes de transferirlas a bolsas de plástico translúcidas, cerradas a su vez, situadas dentro de cajas de bioseguridad cuando se incuban en la estufa.

A continuación, se detallan los pasos de este procedimiento para todas las cepas:

1. Se inoculan y crecen 5 ml de cultivo con cada una de las cepas de *M. tuberculosis* (4 estirpes, H37Rv, CDC1551, y sus dos derivados carentes de *nucS*) en tubos Falcon de 50 ml de polipropileno con cierre de tapón de rosca, durante 2 semanas sin agitación a 37°C en el incubador. Se incuban a 37°C sin agitación en un incubador, dentro de un recipiente de contención biológica durante 2 semanas.
2. Una vez crecidos estos cultivos, se diluyen 1/1.000 para inocular 10 cultivos independientes de 5 ml de medio líquido 7H9 + OADC de cada una de estas cepas en tubos Falcon de 50 ml de polipropileno con tapón de rosca. Se incuban 2 semanas hasta alcanzar fase estacionaria (10^9 células /ml).
3. Se plaquean 0,5 ml de cada uno de los cultivos en placas Petri con medio sólido 7H10 + OADC, suplementadas con rifampicina (2 ug/ml).
4. Se diluyen cada uno de los cultivos hasta la dilución decimal -6 y se plaquean 0.5 ml de cada uno de los cultivos en placas Petri con medio sólido 7H10 + OADC sin antibiótico.
5. Las placas sembradas se incuban a 37°C en un incubador durante 3-4 semanas hasta la aparición de colonias en las placas con antibiótico (mutantes resistentes a rifampicina) y sin antibiótico (viables). Para ello, las placas se sellan con parafilm por el borde, para evitar su apertura, y además se introducen en bolsas de placas Petri apiladas y cerradas, y se colocan dentro de un recipiente de contención biológica dentro del incubador.
6. Se realiza el recuento del número de colonias que aparecen en las placas con antibiótico y sin antibiótico para de esta forma evaluar la tasa de mutación de cada una de las cepas a evaluar.



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

Todos los residuos biológicos que se generen serán inmediatamente inactivados dentro de los recintos de contención (cabins de bioseguridad) mediante la utilización de germicidas de amplio espectro usados en rotación. Posteriormente, los residuos líquidos ya inactivados se enviarán a la planta de tratamiento de efluentes líquidos del laboratorio y los sólidos se autoclavarán. Los procedimientos de autoclavado y esterilización por calor en la planta "Biowaste" se han validado previamente y se validarán periódicamente mediante la utilización de kits de esporas del microorganismo testigo *Bacillus stearothermophilus*. Estas validaciones se han realizado a nivel interno (servicio de bioseguridad del CNB) y a nivel externo (empresas especializadas en validaciones de estos sistemas). Para mayor información remitirse a la solicitud de autorización de la instalación.

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

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

-El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

-Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Seguridad Biológica validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

-La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de seguridad biológica. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.

-La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.

-Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma "in situ" y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.

-El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.



-El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.

-No existen zonas residenciales cercanas al CNB.

-No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

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:

Las operaciones indicadas se realizarán en uno de los tres sub-laboratorios del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica con autorización del 7/03/01; número de notificación: A/ES/00/I-8

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas a seguir serán las expuestas en el reglamento de funcionamiento del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica incluido en la solicitud de autorización.

2) Formación del personal adscrito:

El personal adscrito ha recibido la formación e información indicada en “Descripción de la información suministrada a los trabajadores”, apartado que se adjuntó a la documentación para la solicitud de autorización del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica.

Todo el personal implicado tiene experiencia en la manipulación de los agentes biológicos que se indican en esta solicitud y su formación académica es licenciatura o doctorado.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Viene descrito en el apartado 6.F del reglamento de funcionamiento de la instalación que se incluyó en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

Vienen descritos en los apartados 6.B, 6.C, 6.D y 6.G. del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Vienen descritos en el apartado 6.D. del Reglamento de funcionamiento de la instalación y más específicamente en “Procedimientos y planes de comprobación de la eficacia permanente de las medidas de confinamiento”. Esta información se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio Además el servicio de seguridad biológica velará por el cumplimiento



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

Nº de Registro: 2016-007 Lab218

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.

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

1) Entidad

Nombre: [Centro Nacional de Biotecnología \(CSIC\)](#)
Dirección postal: [c/ Darwin 3](#)
[28049 - Madrid](#)

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: [Fernando Rojo de Castro](#)
NIF: [50295113-R](#)
Cargo: [Director del CNB](#)
Tel: [91 585 45 03](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: direccion.cnb.csic.es

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: [Jesús Blázquez Gómez](#)
NIF: [51632306 C](#)
Cargo: [Profesor de investigación del CSIC](#)
Tel: [91 585 5434](#)
Fax:
Correo electrónico: blazquez@cnb.csic.es

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

Nombre y apellidos: [Fernando Usera Mena](#)
NIF: [00694865-N](#)
Cargo: [Responsable del Servicio de Seguridad Biológica y Protección Radiológica](#)
Tel: [91 585 45 41](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es



5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto
Fernando Usera Mena

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

1. Objetivo de la actividad:

El objetivo principal de este proyecto es determinar la tasa de mutación de las cepas silvestres de *M. tuberculosis* (H37Rv y CDC1551), así como de sus derivados carentes del gen *nucS*. Estudios previos realizados con NucS de *Mycobacterium smegmatis* han revelado que esta proteína es un componente de reparación del ADN clave para mantener la estabilidad genómica en micobacterias. Este componente es esencial para evitar la adquisición y fijación de mutaciones espontáneas en el genoma de estos organismos y, por tanto, ejerce un papel muy importante en el control de la tasa de mutación. Por ello, para evaluar el papel de NucS en *M. tuberculosis* en relación con su posible impacto en el proceso de reparación del ADN, es necesario llevar a cabo experimentos de fluctuación y conocer las tasas de mutación de las cepas silvestres y el mutante *nucS* frente a diferentes antibióticos.

2. Duración prevista de la actividad:

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

4 años

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.
- b) Organismo donante.
- c) Inserto.
- d) Vector.
- e) Organismo modificado genéticamente resultante.
- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.
- g) Efectos para el medio ambiente.

La modificación genética a realizar consiste en la generación de un mutante de delección en fase del gen *nucS* (MT_1321) de *M. tuberculosis*, a partir de las cepas silvestres H37Rv y CDC1551 de *M. tuberculosis*. La estrategia a seguir consiste en la eletroporación de un plásmido que contiene la delección del gen, para su integración en el genoma de ambas bacterias, y de esta forma mediante una doble recombinación, generar el organismo modificado genéticamente carente del gen *nucS*. Se va a realizar la delección en ambas estirpes parentales silvestres, ya que dichas estirpes difieren en



un polimorfismo puntual en este gen diana *nucS*, por lo que es necesario evaluar el efecto de la delección sobre ambos fondos genéticos. Por tanto, el mismo proceso de modificación genética se realizará en paralelo empleando la misma construcción y el mismo procedimiento, pero partiendo de diferentes estirpes parentales. En ambos casos, el organismo modificado genéticamente resultante contendrá una delección en fase del gen *nucS*, sin ningún tipo de marcador de resistencia a antibiótico en su genoma ni efectos polares sobre otros genes.

a) Organismo receptor.

Los organismos receptores son las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y CDC1551, ambas estirpes silvestres para este organismo. Ambas cepas son aislados naturales y se consideran las cepas estándar de trabajo en cualquier laboratorio de tuberculosis.

-La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv se considera la cepa silvestre de referencia para este patógeno. Por tanto, es la cepa de tuberculosis más estudiada en todos los centros de investigación a nivel mundial. Proviene de un aislamiento de un paciente con tuberculosis pulmonar crónica en Nueva York, en 1905 por el Dr. Edward R. Baldwin, y nombrada como cepa H37. Se ha mantenido en laboratorio durante muchos años mediante pases seriados de cultivo, seleccionando aquellas variantes de tipo rugoso algo más virulentas. Esta cepa H37Rv (variante rugosa virulenta) se considera la cepa estándar de trabajo y ha sido designada como neotipo de esta especie, como estirpe silvestre de *M. tuberculosis*.

-La cepa CDC-1551 es una cepa clínica de *M. tuberculosis*, aislada a partir de un brote de casos de tuberculosis en Tennessee y Kentucky, USA. Aunque en un principio se considero una estirpe altamente virulenta, más recientemente se ha comprobado que no es más virulenta que otras cepas, de acuerdo a parámetros de carga microbiana y mortalidad. En este sentido, se ha comprobado que presenta una virulencia similar a la cepa silvestre H37Rv en un modelo de infección de ratón. La principal diferencia de esta cepa es que genera una potente respuesta inmune en el hospedador, incluyendo la secreción de elevados niveles de citoquinas, como TNF-alfa. Esta cepa es un aislado natural, no un OMG, que en muchas ocasiones se utiliza como cepa de referencia en estudios de tuberculosis, al igual que la cepa H37Rv.

b) Organismo donante.

No existe organismo donante como tal, puesto que la modificación genética se realiza por delección de un gen sobre ambas estirpes silvestres. En todo caso, el organismo donante son las mismas estirpes receptoras sobre las que se realizará la eliminación del gen diana.

c) Inserto

El inserto es una delección del gen *nucS* (Rv1321). Se trata de dos fragmentos de ADN situados justo por encima y por debajo del gen *nucS*, pero carentes de la secuencia codificante del gen *nucS*. Estos fragmentos simplemente sirven como elementos de homología para la inserción de la construcción. Al final, tras completar la delección, ninguna de estas secuencias permanece en el genoma, perdiéndose también todo el vector, quedando simplemente una delección en fase del gen diana.

El gen diana a deleccionar es *nucS* (MT_1321, Rv1321). Este gen codifica una proteína de reparación del ADN de tipo nucleasa, denominada NucS. Esta proteína de reparación presenta homólogos en archaeas que han sido previamente caracterizados



a nivel bioquímico. En concreto, esta proteína presenta un dominio N-terminal de unión a DNA y un dominio C-terminal de tipo RecB nucleasa que actúa como nucleasa. La proteína arqueana reconoce estructuras de tipo mismatch, emparejamientos erróneos en el ADN, mediando específicamente un corte de doble cadena, generando extremos protuberantes de 5 nucleótidos. Se ha postulado que este procesamiento de los emparejamientos erróneos promovería la corrección/reparación de mutaciones en el ADN, actuando como un novedoso sistema de “mismatch repair” (MMR) alternativo, dado que las micobacterias carecen del sistema MMR clásico, basado en las proteínas MutS/MutL.

d) Vector

El vector es el plásmido p2NIL (no replicativo en *M. tuberculosis*), que se integra en el genoma de *M. tuberculosis* por recombinación. El proceso de modificación genética consiste en la electroporación de las cepas silvestres de *M. tuberculosis*, con la construcción p2NIL que contiene a su vez la delección del gen *nucS*. Esta construcción se integra en el cromosoma de la bacteria mediante recombinación y luego mediante un segundo evento de recombinación, se genera la delección del gen diana en fase, sin ningún tipo de marcadores de resistencia.

e) Organismo modificado genéticamente resultante

El organismo modificado genéticamente, OMG, es una cepa de *M. tuberculosis* carente del gen *nucS*, es decir, un mutante de delección para este gen. Potencialmente, tiene similares características, en lo que respecta a capacidad de división, crecimiento, patogenicidad y supervivencia. En cualquier caso, se supone que al poseer una menor capacidad de reparación de su ADN, su patogenicidad y/o supervivencia puedan ser afectadas negativamente.

El principal cambio respecto al organismo parental es una capacidad incrementada para la adquisición y fijación de mutaciones en el genoma de este organismo modificado genéticamente (OMG), debido a la deficiencia de este sistema de reparación de emparejamientos erróneos. El OMG generado será totalmente sensible a todos los antibióticos de uso común empleados frente a la tuberculosis, al igual que sus cepas parentales de procedencia. En este sentido, esta modificación no se asocia *per se* con resistencia a antibióticos, pero hay que tener en cuenta que presentará tasas de mutación elevadas respecto a las cepas parentales a diferentes marcadores.

Esta modificación genética no implica, en principio, cambios potenciales en virulencia o patogenicidad respecto a la estirpe parental silvestre (H37Rv y CDC1551), si se tienen en cuenta los estudios precedentes en bacterias patógenas carentes de sistemas de reparación de emparejamientos erróneos. En todo caso, esta cepa podría estar atenuada *in vivo*, debido a la creciente acumulación de errores en su genoma. La misma modificación genética en *Mycobacterium smegmatis*, un organismo no patógeno, no presenta diferencias de crecimiento *in vitro* respecto a la cepa parental, así como similar sensibilidad a antibióticos y otros agentes de daño al ADN y a estrés oxidativo. Finalmente, la transmisibilidad de este patógeno podría verse comprometida, si se comporta de acuerdo a lo esperado para una cepa deficiente en el sistema de reparación de emparejamientos erróneos, lo que facilitaría su confinamiento biológico.

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

Tanto la cepas receptoras como el OMG resultante, son patógenos para humanos, por lo que han de ser manipulados dentro de un laboratorio de contención de tipo 3. Como se



detalló anteriormente, no se esperan cambios en patogenicidad y/o virulencia para el OMG, y de hecho, este organismo es totalmente sensible a todos los antibióticos de uso clínico frente a la tuberculosis.

g) Efectos para el medio ambiente

No se espera impacto sobre el medio ambiente de ningún tipo. La supervivencia de este patógeno en el medio ambiente es muy limitada, puesto que su hospedador natural es el hombre.

2. Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

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

Tipo 1	<input type="checkbox"/>
Tipo 2	<input type="checkbox"/>
Tipo 3	<input checked="" type="checkbox"/>
Tipo 4	<input type="checkbox"/>

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

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

La actividad se va a llevar a cabo en el laboratorio de contención de nivel 3, por lo que el organismo modificado estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo. El riesgo de inoculación accidental de la bacteria recombinante es prácticamente nulo debido a la ausencia de material punzante y cortante en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica y no hay riesgo de contagio por contacto.

b) Concentración y escala utilizadas.

El volumen máximo de cultivo es de 5 ml en cada caso, mientras que el número de cultivos generados es de 10 cultivos por cada cepa.

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

El manejo de células vivas de *M. tuberculosis* se realizará en un grado 3 de confinamiento y tendrá lugar en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica nº150 que pone a disposición las medidas adecuadas para descartar cualquier riesgo biológico.

El protocolo de estimación de la tasa de mutación se realiza mediante un test de fluctuación de Luria y Delbruck. Para este protocolo el volumen máximo de cultivo es de 5 ml en cada caso, mientras que el número de cultivos generados es de 10 cultivos por cada cepa. Los cultivos van a ser crecidos hasta alcanzar una densidad celular de 10^9 células/ml. Igualmente, se requiere plaquear cada cultivo en 1 placa con medio



sólido suplementada con y sin antibiótico (en total 20 placas por cada cepa). Para facilitar el manejo de estos cultivos evitando cualquier riesgo de bioseguridad, se va a dividir todo el trabajo en dos series de experimentos, en uno de ellos se analizará la tasa de mutación de H37Rv y su correspondiente mutante *nucS* y a continuación, una vez completado este experimento, se evaluará la tasa de mutación de CDC1551 y su correspondiente mutante *nucS*.

Los cultivos líquidos se llevarán a cabo en medio líquido 7H9 +OADC (Difco) en tubos Falcon de 50 ml de capacidad, cerrados con tapón de rosca. La inoculación de los cultivos líquidos se realiza con asas desechables (a partir de cultivos de medio sólido) o mediante la transferencia de 5 ul de cultivo (a partir de precultivos de medio líquido). Los cultivos se sitúan en cajas de bioseguridad y serán incubados en la estufa.

Los cultivos sólidos se realizarán en medio sólido 7H10 + OADC (Difco) en placas Petri de 9 cm, previamente secadas para evitar el agua de condensación. La siembra de los medios sólidos se realizará incorporando 0,5 ml de cultivo líquido (concentración máxima de 10^9 células/ml) y extendiéndolas en la placa con una espátula de Driglaski desechable. Las placas se sellan individualmente con parafilm antes de transferirlas a bolsas de plástico translúcidas, cerradas a su vez, situadas dentro de cajas de bioseguridad cuando se incuban en la estufa.

A continuación, se detallan los pasos de este procedimiento para todas las cepas:

5. Se inoculan y crecen 5 ml de cultivo con cada una de las cepas de *M. tuberculosis* (4 estirpes, H37Rv, CDC1551, y sus dos derivados carentes de *nucS*) en tubos Falcon de 50 ml de polipropileno con cierre de tapón de rosca, durante 2 semanas sin agitación a 37°C en el incubador. Se incuban a 37°C sin agitación en un incubador, dentro de un recipiente de contención biológica durante 2 semanas.
 6. Una vez crecidos estos cultivos, se diluyen 1/1.000 para inocular 10 cultivos independientes de 5 ml de medio líquido 7H9 + OADC de cada una de estas cepas en tubos Falcon de 50 ml de polipropileno con tapón de rosca. Se incuban 2 semanas hasta alcanzar fase estacionaria (10^9 células /ml).
 7. Se plaquean 0,5 ml de cada uno de los cultivos en placas Petri con medio sólido 7H10 + OADC, suplementadas con rifampicina (2 ug/ml).
 8. Se diluyen cada uno de los cultivos hasta la dilución decimal -6 y se plaquean 0.5 ml de cada uno de los cultivos en placas Petri con medio sólido 7H10 + OADC sin antibiótico.
 9. Las placas sembradas se incuban a 37°C en un incubador durante 3-4 semanas hasta la aparición de colonias en las placas con antibiótico (mutantes resistentes a rifampicina) y sin antibiótico (viables). Para ello, las placas se sellan con parafilm por el borde, para evitar su apertura, y además se introducen en bolsas de placas Petri apiladas y cerradas, y se colocan dentro de un recipiente de contención biológica dentro del incubador.
 10. Se realiza el recuento del número de colonias que aparecen en las placas con antibiótico y sin antibiótico para de esta forma evaluar la tasa de mutación de cada una de las cepas a evaluar.
4. **Determinación de la clasificación y medidas de confinamiento definitivas y confirmación de su idoneidad:**

Actividad confinada de Tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.



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.)

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

-El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

-Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Seguridad Biológica validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

-La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de seguridad biológica. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.

-La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.

-Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma "in situ" y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.

-El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.

-El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.

-No existen zonas residenciales cercanas al CNB.



-No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

-Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

Vienen indicadas en el Plan de emergencias y evacuación del CNB incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

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

Vienen indicados en el Plan de emergencias y evacuación del CNB incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

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

El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio