



PARTE A Y C

DIRECCION GENERAL CALIDAD Y
EVALUACIÓN AMBIENTAL

**Actividades de
tipo 3 y 4**

COMISIÓN NACIONAL DE
BIOSEGURIDAD

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

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Responsables de la actividad

a. Entidad

Nombre: Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC)

Dirección postal: Jaime Roig 11, 46010 Valencia

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

NIF: XXXXXXXXX

Cargo: Director del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC)

Tel: XXXXXXXXX

Correo electrónico: XXXXXXXXXXXX

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

NIF: XXXXXXXXXXXX

Cargo: Científico titular

Tel: XXXXXXXXX

Correo electrónico: XXXXXXXXXXXX

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

Nombre y apellidos: XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

NIF: XXXXXXXXXXXX

Cargo: Técnico responsable Laboratorio NCB3

Tel: XXXXXXXXXXXXXXXX

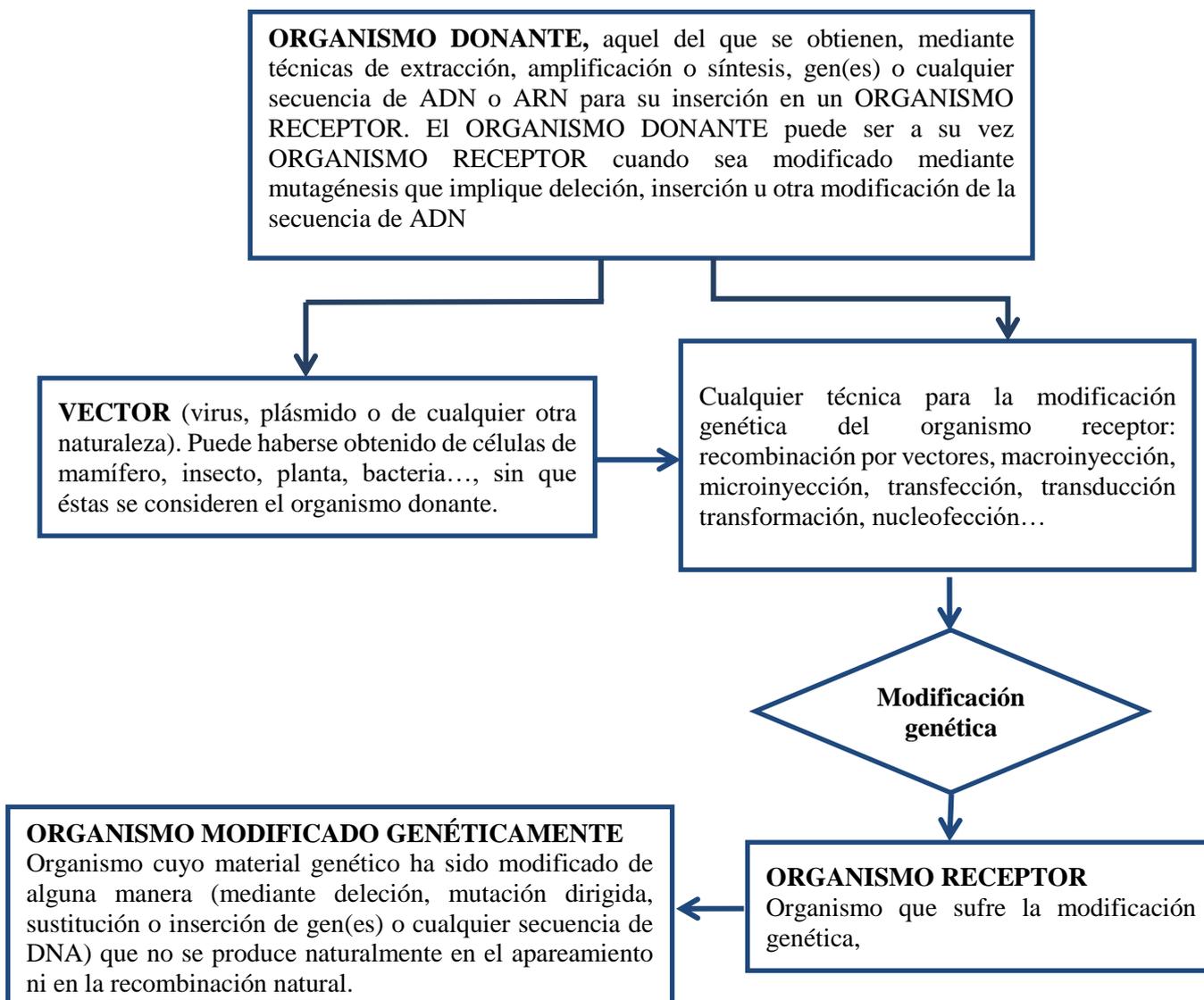
Correo electrónico: [XXXXXXXXXXXXX](#)

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

XXXXXXXXXXXXX



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





II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1. Debe señalarse si para la ejecución de esta actividad se recibe financiación del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica. Esta información es necesaria para determinar si la actividad se encuentra dentro del supuesto del artículo 3.2.b) de la Ley 9/2003 y, por lo tanto, la competencia recae en la Administración General del Estado.

SI NO

Si la respuesta a la pregunta anterior es **SI**, debe justificarlo especificando¹:

- Nombre de la convocatoria:

Proyectos I + D + i Retos Investigación Proyectos de Generación de Conocimiento

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

PID2022-137607OB-I00, XXXXXXXXXXXXXXXX

- Organismo financiador:

Ministerio de Ciencia e Innovación

Otro tipo de financiación²

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

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

A/ES/20/I-45 (Anexo I)

La instalación está autorizada a la Fundación FISABIO-Salud Pública. El IBV-CSIC y la Fundación FISABIO-Salud Pública tienen un convenio para regular el uso compartido del laboratorio de bioseguridad P3 en relación con el desarrollo de proyectos de investigación. Se adjunta en el Anexo II copia de este. Asimismo, existe una coordinación de actividades empresariales entre ambos centros. En el Anexo III se adjunta copia de esta

- Fecha de autorización de la instalación:

27/10/2021

Si el OMG no se genera en la instalación³:

- Nombre de la instalación de origen del OMG:

¹TASAS

Están exentos del pago de la tasa los casos en los que se cumplan dos requisitos, que la actividad se realice en el marco de los Planes Estatales de Investigación Científica y Técnica y de Innovación; y que se desarrolle por una institución, ente u órgano público.

²Se deberá aportar la información que permita verificar esta circunstancia.

³Debe tenerse en cuenta que, si los OMG proceden de otra instalación española, ésta deberá haber cumplido con los requisitos establecidos en la legislación española de OMG.



NO APLICA

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

NO APLICA



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

NO APLICA

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

NO APLICA

3. Finalidad de la actividad:

Estudios de genómica funcional con la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. En el presente proyecto pretendemos estudiar la arquitectura genética de la eficacia y la resistencia a antibióticos en *M. tuberculosis*. Para ello, queremos generar una serie de mutantes con genes específicos silenciados y posteriormente testar el efecto de dicho silenciamiento en la eficacia y la sensibilidad a antibióticos clínicamente relevantes en el tratamiento de la tuberculosis. La técnica que vamos a utilizar para generar los mutantes ya ha sido usada con anterioridad (Wong and Rock, 2021, *Methods in molecular biology*, 2314, 343-364; ver ANEXO IV) y consiste en la inserción de un constructo con tecnología CRISPRi (CRISPR interference) en el genoma de la bacteria con la ayuda de un plásmido. Los mutantes se testarán *in vitro*. El proceso se realizará íntegramente de forma confinada en el interior del laboratorio NCB3.

4. Clasificación de la actividad:

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

Tipo 3

Tipo 4

III. INFORMACIÓN RELATIVA A LA OBTENCIÓN DEL OMG

1. Organismo receptor del cual deriva el OMG:

Células humanas/primates Detallar las líneas celulares:

Células: otras Detallar las líneas celulares:

⁴ Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- (ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas) del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones.
- Reglamento (CE) N° [1/2005](#) del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas [64/432/CEE](#) y [93/119/CE](#) y el Reglamento (CE) N° [1255/97](#), Ley [32/2007](#), de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE núm. 268, 8.11.2007)
- Reglamento (CE) N° [1946/2003](#) del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente [Diario Oficial L 287 de 5.11.2003].
- Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad. Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: <https://bch.cbd.int/protocol/>
- [Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances](#) Edición bianual de la OMS



- Animal
- Planta
- Bacteria
- Hongo
- Virus
- Protozoos

-Especificar el nombre científico y común:

Mycobacterium tuberculosis, bacilo de Koch / bacilo de la tuberculosis

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i)** Técnicas de aislamiento: *M. tuberculosis* cepa se cultiva rutinariamente sobre medio sólido en placa Petri con medio Middlebrook 7H10 o bien en 10 mL de medio líquido Middlebrook 7H9 en tubo Falcon de 50 mL a 37°C en el laboratorio NCB3. Los cultivos se almacenan congelados a -80°C en un arcón-congelador en el laboratorio NCB3, en viales de 1 mL con tapón de rosca y añadiendo 10% de glicerol como crioprotector. Todas las manipulaciones de la bacteria se realizan en cabinas de bioseguridad tipo IIA.
- ii)** Técnicas de identificación: La bacteria se puede identificar mediante cultivo en medio Lowenstein-Jensen observando la morfología de las colonias (secas y con aspecto grumoso) o mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. En el laboratorio se identifican cepas de tuberculosis de forma rutinaria mediante PCR específica o secuenciación.
- iii)** Marcadores genéticos: Secuencias específicas de *M. tuberculosis* como IS6110, secuenciación de rpoB, MIRUs.
- iv)** Marcadores fenotípicos: Capacidad de crecer en medio MGIT específico de micobacterias, tiempo de generación largo (24h/generación) que hace que las colonias sólo sean visibles 3 semanas tras la siembra, aspecto seco y grumoso característico de las colonias, necesidad de usar la tinción de Ziehl-Neelsen para poder teñirlas.
- v)** Estabilidad genética: Estable, la bacteria no presenta elementos móviles ni casos de recombinación genética

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

SI

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

Son cepas puras cultivadas exclusivamente en nuestro laboratorio

NO

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

c. Modificación genética anterior:

SI

- Describir:



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

NO

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

SI

Para:

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



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

Mycobacterium tuberculosis normalmente infecta las vías respiratorias. Los síntomas en caso de infección incluyen tos, fiebre y fatiga y lesiones pulmonares, existiendo tratamiento eficaz con el que se logra la total curación.

NO

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

SI

NO

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

El grupo ha trabajado con el organismo en las instalaciones desde enero de 2015, cultivándolo y almacenándolo de forma rutinaria sin que ocurriera ningún incidente o accidente. El responsable de la instalación, XXXXXXXXXXXX, ha realizado los siguientes cursos en bioseguridad: “Normas de trabajo y gestión en laboratorios de contención biológica” y “Curso avanzado de formación en bioseguridad”. Así mismo lleva acumulados 4 años como responsable de bioseguridad de la instalación aquí referida y 3 años en una instalación similar en el Hospital General de Valencia encargada del diagnóstico de la tuberculosis. El director del grupo XXXXXXXXXXXX tiene más de diez años de experiencia en trabajo con *M. tuberculosis*. Finalmente, el grupo tiene más de un año de experiencia en generación y manejo de *M. tuberculosis* modificada genéticamente (actividad autorizada en octubre de 2021, referencia A/ES/20/100, Anexo IV).

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

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

SI

- Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

esporas

endosporas

quistes

esclerocios

esporas asexuales (hongos)

esporas sexuales (hongos)

otros, especifíquese

NO

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

El organismo es incapaz de multiplicarse fuera de su hospedador o de las condiciones del laboratorio. Presenta supervivencia limitada en el medio ambiente, pudiendo persistir como máximo algunos días. *M. tuberculosis* es sensible a las condiciones ambientales, tales como la luz ultravioleta, el calor y la desecación.

- iii) Posibles nichos ecológicos:



Puede infectar seres humanos y ocasionalmente otros mamíferos, fuera de estos hospedadores no tiene nicho ambiental posible conocido. No se encuentra de forma natural en el ambiente.

iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

Incapaz de replicar fuera del hospedador

h. Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

Ninguna



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Ninguna a excepción de infección en humanos con tratamiento disponible

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

El organismo receptor infecta poblaciones humanas en todo el mundo.

j. Hábitat natural del organismo:

Es capaz de infectar humanos y otros animales.

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

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

-Especificar el nombre científico y común:

Escherichia coli, *Streptococcus thermophilus*, Micobacteriófago L5. Sin nombre común.

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI NO

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

SI NO APLICA, ya que no se trabaja con ella

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

NO APLICA

NO

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

NO APLICA

c. Modificación genética anterior:

SI

– Describir:

NO APLICA

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

NO APLICA



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

NO APLICA

SI Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros

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

NO APLICA

NO

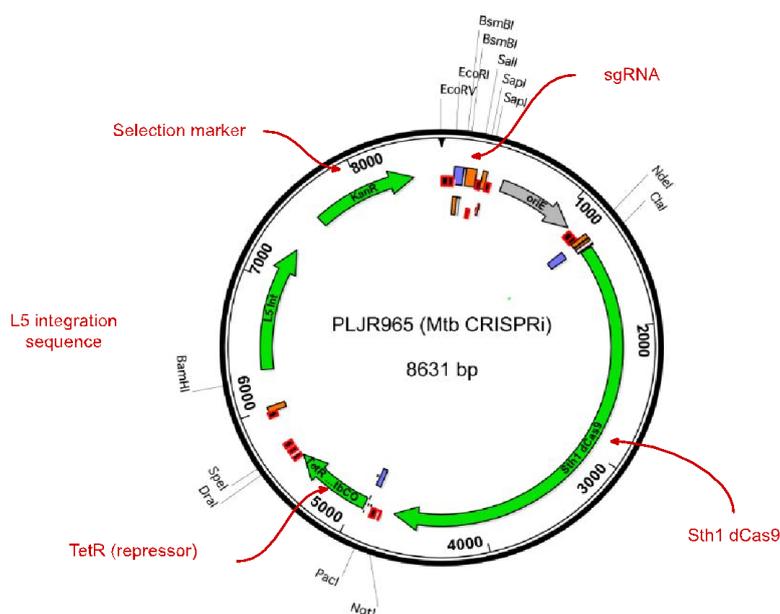
- e. En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI

NO NO APLICA

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

Vamos a usar un inserto de 8631 pb, secuencia disponible en <https://www.addgene.org/115163/sequences/>. A continuación puede verse una representación esquemática del inserto dentro del plásmido que usaremos como vector, que contiene un origen de replicación, un represor TetR y un gen reportero de resistencia a kanamicina (todos de *E.coli*), un gen Cas9 sin función catalítica de *Streptococcus thermophilus*, una secuencia de integración L5 con su integrasa asociada y una región sgRNA de *Mycobacterium sp*





g. Método de obtención:

- Extracción
- PCR
- Síntesis *in vitro*

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

- Integrasa del fago L5: proteína que media la integración del fago L5 en el genoma de micobacterias
- sgRNA: Secuencia corta homóloga al inicio del gen que queremos silenciar unida a una secuencia de unión a dCas9
- dCas9: gen de la caspasa 9 del sistema CRISPR de *Streptococcus thermophilus* con la función catalítica inactivada. Reconoce y corta secuencias específicas de DNA en el organismo donante (en este caso la función de corte está inactivada), y es parte del “sistema inmune” de la bacteria.
- TetR: represor del gen de resistencia a tetracuclina de *E. coli*.
- oriE: origen de replicación proveniente de *E.coli*.
- kanR: gen de resistencia a kanamicina proveniente de *E. coli*.

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

No



IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

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

Silenciamiento inducible de genes para buscar mutantes con sensibilidad alterada a antibióticos antituberculares y así poder determinar la arquitectura genética de la eficacia y la resistencia a antibióticos de *M. tuberculosis*. El objetivo es silenciar genes relevantes para la eficacia y resistencia a antibióticos de las especies estudiadas. La lista de dianas posibles comprende todos los genes del genoma, pero seleccionaremos sólo un subconjunto reducido. La lista de genes específicos que vamos a silenciar la generaremos a partir de los resultados de un experimento de modificación genética previo (referencia autorización A/ES/20/100, Anexo IV), siendo todos los genes del genoma susceptibles de ser incluidos en la lista.

2. Tipo de modificación genética:

- Inserción de material genético
- Deleción de material genético
- Sustitución de bases
- Otros, especifique:

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

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

Otros, especifique:

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

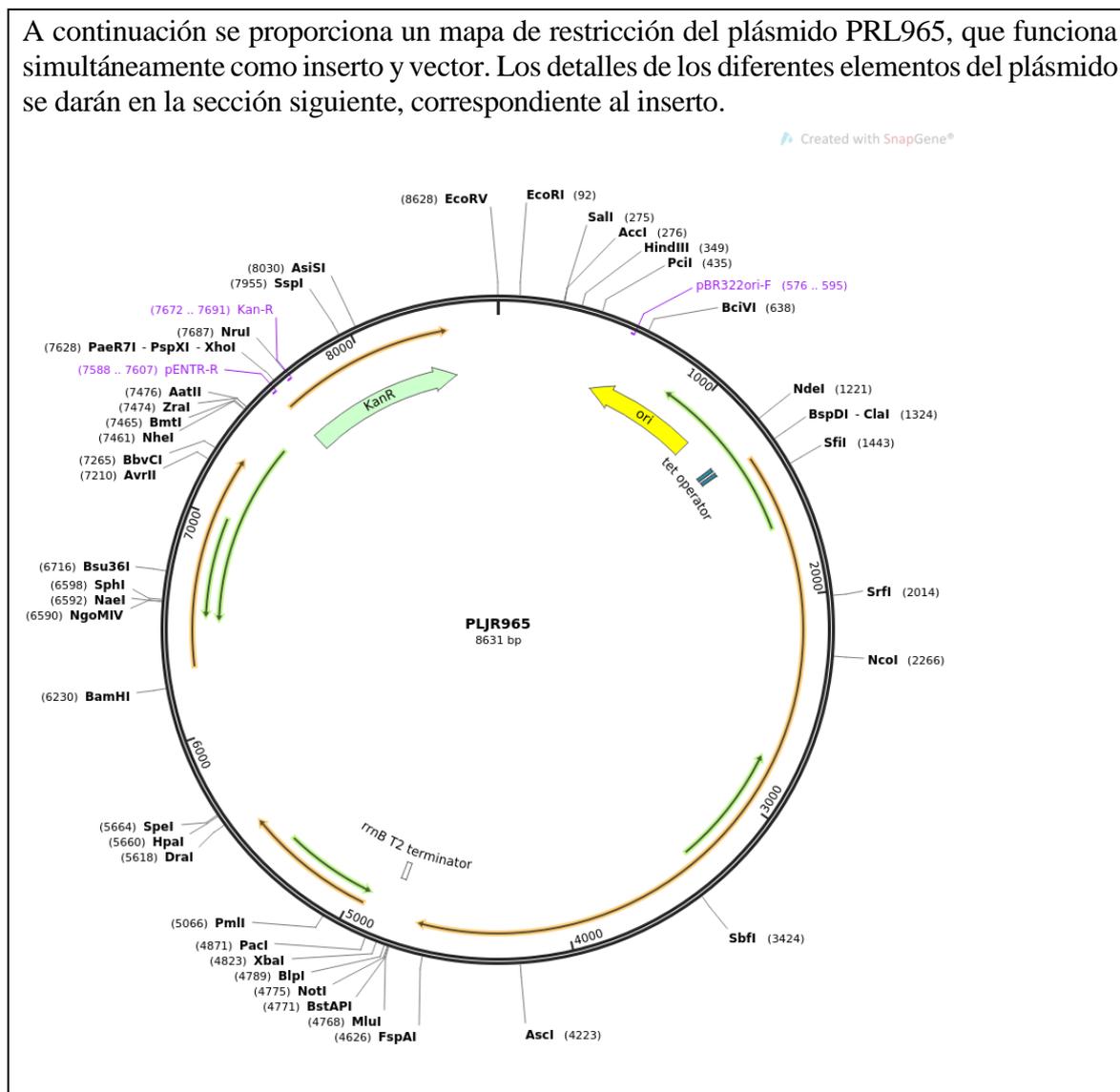
a. Tipo e identidad del vector (plásmido, virus, otros):

Vamos a usar el plásmido PRLJ965, que es un plásmido no comercial desarrollado por el laboratorio de Sarah Fortune y que se distribuye a través de la plataforma Addgene (<https://www.addgene.org/115163/>). Prácticamente todas las secuencias presentes en el plásmido son relevantes para la modificación genética que vamos a llevar a cabo.



- i) Aportar mapa de restricción del vector. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación y cualquier otro elemento presente en el vector.

A continuación se proporciona un mapa de restricción del plásmido PRL965, que funciona simultáneamente como inserto y vector. Los detalles de los diferentes elementos del plásmido se darán en la sección siguiente, correspondiente al inserto.



- ii) Si se trata de virus:

- Es defectivo en replicación SÍ NO NO APLICA
- Indicar cómo se obtiene el vector viral. Si se utilizan plásmidos para su obtención aportar mapa de restricción del/los plásmidos. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes.

NO APLICA

- b. Gama de hospedadores del vector:

Bacterias

- c. Características de la movilidad del vector:



i) factores de movilización

No posee

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

NO APLICA

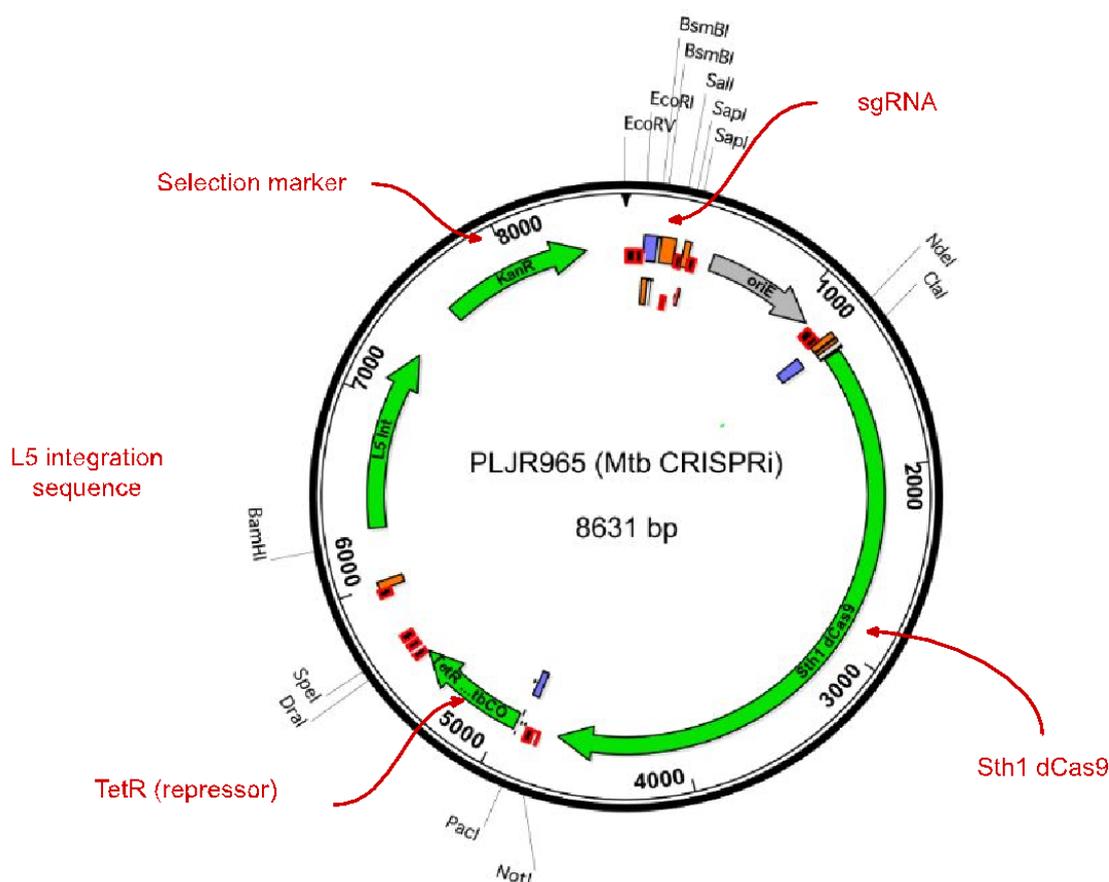
iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?

El plásmido se inserta en el genoma del organismo receptor y no es movilizable

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

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

Inserto de 8631pb, secuencia disponible en <https://www.addgene.org/115163/sequences/>. A continuación se proporciona un mapa de restricción del inserto junto con el vector:



a. Secuencia de integración L5 (fago L5): secuencia requerida para que el inserto pueda integrarse en el sitio de integración L5 en el genoma de la bacteria

b. Integrasa del fago L5: proteína que media la integración del plásmido en el genoma de la bacteria

c. sgRNA: Secuencia corta homóloga al inicio del gen que queremos silenciar. Son 20 nt homólogos a *M. tuberculosis* y 81 nt correspondientes a la secuencia de unión a la dCas9 de *Streptococcus thermophilus*. Su función es marcar la diana de dCas9.



- d. dCas9: gen de la caspasa 9 de Streptococcus thermophilus con la función catalítica inactivada. Este gen se expresará en el OMG y la proteína se unirá al sgRNA para silenciar un gen de tuberculosis de nuestra elección.
- e. TetR: represor proveniente de E. coli que regula la transcripción del gen dCas9. Este gen reprime la transcripción de dCas9 hasta que añadimos anhidrotetraciclina al medio, por lo que podemos controlar la expresión de la proteína.
- f. oriE: origen de replicación proveniente de E.coli que se usa en fases iniciales del proceso cuando el inserto se encuentra en forma de plásmido, ya que permite su amplificación
- g. kanR: gen de resistencia a kanamicina proveniente de E. coli que sirve para seleccionar las bacterias que han incorporado el inserto en el genoma.

b. Información sobre los genes estructurales:

Gen de resistencia a kanamicina KanR, Tamaño(pb): 816 Secuencia:

```
MSHIQRETSCSRPRLNSNMDADLYGYKWARDNVGQSGATIYRLYGKPHAPFLK  
HGKGSVANDVTDEMVRNLNWLTEFMPLPTIKHFIRTPDDAWLLTTAIPGKTAQVLE  
EYPDSGENIVDALAVFLRRLHSIPVCNCPFNDRVFRLAQAQSRMNNGLVDASDFD  
DERNGWPVEQVWKEMHNLLPFSPDSVVTHGDFSLDNLFDEGKLGICIDVGRVIA  
DRYQDLAILWNCLGEFSPSLQKRLFQKYGIDNPD MNKLQFHLMLDEFF
```

Gen del represor Tet, Tamaño(pb): 624, Secuencia:

```
MSRLDKSKVINSALELLNEVGIEGLTTRKLAQKLGVEQPTLYWHVKNKRALLDAL  
AIEMDRHHTHFCPLEGESWQDFLRNNAKSFRCALLSHRDGAKVHLGTRPTEKQY  
ETLENQLAFLCQQGFSLENALYALSAVGHFTLGCVLEDQEHQVAKEERETPTT  
DSMPPLLRQAIELFDHQGAEPFLGLELIICGLEKQLKCESGS
```

Gen de la caspasa modificada dCas9, Tamaño(pb): 3366, Secuencia:

```
MSDLVLGLAIGIGSVGVGILNKVTGIEIHKNSRIFPAAQAENNLVRRRTNRQGRRLAR  
RKKHRRVRLNRLFEEGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNEELFIALKNMVK  
HRGISYLDASDDGNSSVGDYAQIVKENSQLETKTPGQIQLERYQTYGQLRGDFT  
VEKDGKKHRLINVFPTSAYRSEALRILQTQQEFNPQITDEFINRYLEILTGKRKYHG  
PGNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYDEFRAAKASYTAQEFNLLNDLN  
NLTVPTETKKSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAKLFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDK  
SGKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETLDKLA YVLT LNTEREGIQEALHEFA  
DGSFSQKQVDELVQFRKANSSIFGKGWHNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRL  
GKQKTTSSSNKTKYIDEKLLTEEIYNPVVAKSVRQAIVNAAIKEYGDFDNVIEM  
ARETNEDDEKKAIQKIQKANKDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLAT  
KIRLWHQQGERCLYTGKTIHDLINNSNQFEVDAILPLSITFDDSLANKVLVYATA  
NQEKGQRTPYQALDSMDDAWSFRELKAFVRESKTL SNKKKEYLLTEEDISKFDVR  
KKFIERNLVDTRYASRVVLNALQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTR  
DTYHHHAVDALIAASSQLNLWKKQKNTLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVF  
KAPYQHFDLTKSKEFEDSILFSYQVDSKFNKISDATIYATRQAKVGKDKADETY  
VLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKKDKSKFLMYRHDPQTFEKVIEPILENYPNKQIND  
KGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNGPEIKSLKYYSKLGHNHIDITPKDSNNK  
VVLQSVSPWRADVFNKTTGKYEILGLKYADLQFDKGTGTYKISQEKYNDIKKKE
```



GVDS DSEFKFTLYKNDLLL VKDTETKEQQLFRFLSRTMPKQKHVELKPYDKQKF
EGGEALIKVLGNVANS GQCKKGLGKSNISIYKVRTDVLGNQHIIKNEGDKP KLDF

Gen de la integrasa del fago L5, tamaño(pb): 1116 Secuencia:

MARRGWGSLKTQRSGRIQASYVNPQDGVRYVALQTYDNKMDAEAWLAGEKRLI
EMETWTPPQDRAKKAASAITLEEYTRKWVERDLADGTRDLYSGHAERRIYPVL
GEVAVTEMTPALVRAWWAGMGRKHPTARRHAYNVLRAVMNTAVEDKLIAENPC
RIEQKAADERDVEALTPEELDIVAAEIFEHYRIAA YILAWTSLRFGELIELRRKDIVD
DGMTMKLRVRRGASRVGNKIVVGNAKTVRSKRPVTVPPHVAEMIRAHMKDRTK
MNKGPEAFLVTTTQGNRLSKSAFTKSLKRGYAKIGRPELRIHDLRAVGATFAAQAG
ATTKEL MARLGHTTPRMAMKYQMASEARDEAIAEAMSKLAKTS

c. Información sobre los elementos reguladores:

Operador tet (induce la expresión de dCas9), Tamaño(pb): 19

Secuencia de integración L5, Tamaño(pb): 43

Origen de replicación, Tamaño(pb): 89

sgRNA (indica la diana de dCas9), Tamaño(pb): 101

d. ¿Ha sido secuenciada?

Si, secuencia disponible en <https://www.addgene.org/115163/sequences/>

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

No, todas las secuencias son necesarias

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

No

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

a. Si el vector es un plásmido

i) Se pierde

ii) Se inserta en el genoma

- Aleatoriamente

- En un sitio definido

o Localización cromosómica:

Sitio de integración attB que en la cepa de referencia se encuentra en las coordenadas 2765404 a 2765540. Es una region no codificante.

o Secuencias colindantes:

ORFs que codifican para los tRNAs de la prolina y la glicina

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

No



iii) Se mantiene en forma episódica

- Número de copias:

NO APLICA

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

NO APLICA

b. Si el vector es un virus:

i) Se mantiene en forma episódica NO APLICA

ii) Se inserta en el genoma NO APLICA

- La inserción se produce al azar

- La inserción es específica

o Localización cromosómica:

NO APLICA

o Secuencias colindantes:

NO APLICA

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

NO APLICA

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

NO APLICA

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

i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

ii) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

iii) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)



V. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG)

1. Descripción del OMG final

Cepa pura de *Mycobacterium tuberculosis* que reprime un único gen en presencia de anhidrotetraciclina y que presenta resistencia a kanamicina como marcador fenotípico.

2. Características genéticas y fenotípicas modificadas del organismo receptor como resultado de la manipulación genética:

- a. ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese:

No, no se han descrito mutantes de dicha cepa o de otras cepas de tuberculosis que le permitan llevar un estilo de vida libre.

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

Esperamos que aparezcan mutantes con capacidad alterada de crecer en cultivo en el laboratorio pero es improbable que aparezcan cambios drásticos. Es una de las propiedades que esperamos medir al generar el OMG.

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

No es esperable que se produzcan incrementos relevantes en patogenicidad ya que para empezar, el silenciamiento debe inducirse de forma específica. Además, la alteración es el silenciamiento de un gen ya presente en el genoma y es más probable que produzca defectos del crecimiento. Experimentos previos con mutantes de inserción encontraron 194 genes esenciales para la infección pero ningún mutante que incrementa la patogenicidad al inactivar el gen (Sasseti et al., 2003, PNAS 100: 12989–12994)

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

No, puesto que la modificación no le permitirá a la bacteria llevar un modo de vida libre

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

No aplica

- f. Marcadores específicos del OMG:

Contiene un inserto de 8,8 kb de secuencia conocida, resistencia fenotípica a kanamicina

3. Información sobre la estabilidad genética previsible 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. Justificar:

Nula, porque la probabilidad de movilización del inserto es extremadamente baja o inexistente



5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

El OMG posee una secuencia específica conocida que es aquella del inserto. La presencia y ubicación del inserto puede confirmarse por pcr específica o secuenciación

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

Las bacterias transformadas con el inserto se aíslan mediante cultivo selectivo en medio con kanamicina. Una vez aislado, se manejará y cultivará exclusivamente en el interior del laboratorio NCB3 en cabinas de bioseguridad tipo IIA con triple etapa de filtración. Los cultivos se realizarán de forma rutinaria sobre medio Middlebrook 7H10 agar en placa petri o en medio líquido Middlebrook 7H9 en tubos de 50 mL (volumen cultivo = 10 mL) o en botellas de cultivo (volumen cultivo 100 mL).



VI. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

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

Generación de mutantes de interés. Determinación de eficacia (curvas de crecimiento, capacidad de infección de cultivos celulares) y sensibilidad a antibióticos (concentración mínima inhibitoria, curvas de letalidad) de los mutantes de interés. Todos los ensayos se llevarán a cabo exclusivamente *in vitro*.

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

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

- i) Para preparación de lotes

Se cultivará sobre agar en placa Petri, en tubos falcon con 10 mL de cultivo y si fuera necesario en botellas con 100 mL de cultivo líquido a una densidad de 10^8 - 10^9 cfu/mL

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

Se usarán los mismos volúmenes máximos que en la preparación de lotes. Se inocularán los cultivos líquidos o los cultivos celulares mediante pipeteo

- b. Número aproximado de plantas por ensayo:

No se van a realizar

- c. Número aproximado de animales por ensayo:

No se van a realizar

3. Naturaleza de las operaciones:

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

4. Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

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

2024-2027. Estas actividades se van a realizar mediante la financiación obtenida a través de dos proyectos: el proyecto PID2022-137607OB-I00, el proyecto ERC TB-RECONNECT y el proyecto del MICINN PID2019-104477RB-I00 (activo hasta junio de 2024).

VII. EVALUACIÓN DE RIESGO

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



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

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

a. Organismo receptor.

Mycobacterium tuberculosis: Se trata de un organismo patógeno que provoca una enfermedad grave en humanos, aunque existe un tratamiento eficaz

b. Organismo donante.

Streptococcus thermophilus es una bacteria anaerobia ambiental de nivel de riesgo 1 y no presenta riesgo para humanos. *E. coli* es una bacteria comensal no nociva para humanos. El micobacteriófago L5 sólo infecta bacterias y es inocuo para humanos.

c. Inserto.

El inserto no puede cambiar de sitio tras la integración porque carece de medios para movilizarse. El gen de resistencia a kanamicina (procedente de *E. coli*) no aumenta la virulencia ni la patogenicidad. Sí aumenta la resistencia al antibiótico kanamicina, pero lo hace de forma muy específica ya que codifica una enzima que degrada exclusivamente este antibiótico, por lo que no confiere resistencia cruzada a otros antibióticos. El resto de secuencias (procedentes de *S. thermophilus*, *E. coli* y el micobacteriófago L5) no cambian la virulencia o patogenicidad.

d. Vector.

El organismo resultante tendrá un sistema de silenciamiento génico mediado por Cas9 (con secuencias procedentes de *S. thermophilus*, *E. coli* y el micobacteriófago L5) en el sitio L5 del genoma, por lo que se espera que el fenotipo resultante sea el de silenciamiento del gen elegido. Las mutaciones de silenciamiento génico son habituales en entornos naturales, por lo que mutantes con las mismas propiedades que los obtenidos aquí pueden aparecer de forma espontánea. El inserto es estable y no es probable que cambie de ubicación.

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

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

No se espera ninguno

b. Efectos para el medio ambiente.

Ninguno, ya que estas cepas son incapaces de replicar fuera del hospedador, no están implicadas en procesos ambientales y son de uso exclusivo en laboratorio. No existe la posibilidad de transferencia del material genético a otros organismos al ser un inserto estable no movilizable.

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

Las fases más críticas corresponden a las manipulaciones en cabina para la generación y el testado del OMG. Todas estas manipulaciones incluyen electroporación de la bacteria para generar el OMG, cultivo del OMG para su crecimiento, realización de ensayos de crecimiento, determinación de resistencia a antibióticos e infección de cultivos celulares.

⁵. Si se considera que no tienen efectos adversos para la salud y el medio ambiente, también hay que justificarlo.



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

El trabajo a realizar con los OMGs obtenidos se realizará en el Laboratorio NCB3. Dicho laboratorio consta de 7 salas de acceso consecutivo conectadas entre sí por un sistema de puertas con entrada y salida independientes, provistas de ventilación continua con presión negativa y de filtros HEPA en la salida de aire. Las tres primeras salas están destinadas al acceso exclusivo de personas, para el cambio de ropa y protección con Equipos de Protección Individual (EPI), la sala intermedia actúa de corredor comunicando con los laboratorios y las tres últimas salas están destinadas a realizar trabajos de microbiología con agentes biológicos que requieren nivel de bioseguridad 3. El conjunto dispone de un circuito cerrado de televisión que permite la observación del operador desde el. Esta instalación es descontaminada al menos una vez al mes con un sistema de dispersión (Nouvair) que elimina microorganismos en el ambiente, cabinas y encimeras. El acceso a la instalación está restringido al personal autorizado mediante acceso electrónico y siempre bajo la supervisión del técnico encargado XXXXXXXXXXXXXXXX.

Toda manipulación del OMG se realizará en una cabina de bioseguridad tipo IIA con triple etapa de filtración en el interior del laboratorio NCB3. La manipulación la hará siempre personal formado específicamente para el trabajo con este tipo de microorganismos y siguiendo procedimientos normalizados de trabajo (PNT, Anexo V). Las manipulaciones se realizarán siempre con material desechable (asas de siembra, pipetas serológicas, puntas de pipeta con filtro, etc), siguiendo en todo momento protocolos de minimización de formación de aerosoles y desinfectando químicamente el material en la misma cabina conforme se va utilizando. La electroporación se realizará en la cabina de bioseguridad y con protocolos de contención específicos para proteger al investigador de posibles aerosoles. El cultivo se realizará preferentemente en placa petri o en tubo Falcon con volumen de cultivo de 10 mL (10^8 - 10^9 cfu/mL) con doble contención. Puntualmente será necesario usar un volumen de trabajo de 100 mL y se trabajará de forma especialmente cuidadosa en esos casos. En el caso de infectar cultivos celulares las placas se sellarán y se colocarán en un recipiente estanco para evitar derrames. Se trabajará siempre con equipo de protección individual desechable o autoclavable (mono tyvek, guantes, cubrezapatos, capuz con respirador y manguitos). Todos los residuos generados en cada manipulación serán inactivados químicamente y autoclavados inmediatamente.

VIII. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA⁶

1. Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Todos los trabajadores deben conocer y aplicar los protocolos normalizados de trabajo en todo momento dentro de las instalaciones. Toda esta información puede encontrarse en la documentación de la autorización de esta instalación, referencia A/ES/20/I-45. Periódicamente, el responsable del laboratorio reforzará dichas prácticas mediante entrenamiento y evaluación de los trabajadores

2. Formación del personal adscrito:

⁶ En el caso de que la actividad se realice en una instalación ya autorizada, se deberán describir las medidas de protección adicionales a las descritas en el formulario B que se presentó en la solicitud para la autorización de la instalación, teniendo en cuenta el riesgo específico de la actividad.



El responsable del laboratorio ha realizado los siguientes cursos en bioseguridad: “Normas de trabajo y gestión en laboratorios de contención biológica” y “Curso avanzado de formación en bioseguridad” Asimismo, cuenta con 4 años como responsable de bioseguridad de la instalación aquí referida y 3 años en una instalación similar en el Hospital General de Valencia encargada del diagnóstico de la tuberculosis. Durante los cuales no se registró ninguna incidencia. Al resto de personal se le somete a un entrenamiento previo, consistente en formación teórica y un entrenamiento práctico con microorganismo no patógeno. La duración total de la formación la estimará el responsable del laboratorio en función de un ejercicio práctico evaluable que deberá ser superado por el personal para poder desempeñar su trabajo en el laboratorio NCB3

3. Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

La limpieza y desinfección de superficies de trabajo es inmediatamente después de terminar de trabajar. Mensualmente se realizará una limpieza y desinfección de todas las superficies del laboratorio. Todo ello se realiza con el germicida Limoseptol FA al 20% y con etanol al 70%, además de irradiar la cabina con luz UV durante una hora al finalizar el trabajo. La limpieza y desinfección de la cabina de seguridad es siempre al comenzar y terminar el trabajo. Con una periodicidad quincenal se le realizará una limpieza y desinfección completa. Todo ello realizado también con el germicida limoseptol FA y etanol al 70% También disponemos de un nebulizador “Nouvair” de Jose Collado S.A. para la descontaminación de todo el laboratorio mediante peróxido de hidrogeno y acidoácido peracético (F66-SR)

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

Revisiones anuales del sistema de ventilación y cabinas de seguridad biológica por empresa externa. La eficacia del autoclave se verifica mediante el uso en cada carga de indicadores químicos de esterilización y mensualmente mediante indicadores biológicos.

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

Diariamente, el operario está obligado a comprobar visualmente el nivel de la presión negativa de toda la sala de contención nivel 3 antes de entrar a trabajar. Existen tres pantallas informativas, una antes del NCB2, una antes del NCB3 y otra dentro de la sala de esterilización. Además, en caso de fallo de las pantallas, existen 3 manómetros analógicos situados encima de la puerta de cada laboratorio (1, 2 y 3) Miden la diferencia de presión entre la sala de esterilización y los laboratorios, que debe ser de -20Pa. De todas maneras, cuando la presión baja de ese margen se dispara una alarma luminosa y acústica que avisa de ello. A su vez, el responsable del laboratorio, el servicio de Seguridad y el de Mantenimiento disponen de un control y registro informático diario de las temperaturas, caudales y presiones mediante sistema Metasys de gestión del Laboratorio, donde salta automáticamente el aviso de alarma.

La comprobación de las cabinas de seguridad biológica también es diaria y siempre antes de empezar a trabajar. En este caso las propias cabinas disponen de una pantalla que indica mediante alarma acústica y cambio de color si las velocidades de extracción y de barrera son las correctas. De todas maneras, el operario debe comprobar visualmente si los valores de velocidad de extracción y de barrera son los indicados en el protocolo (P3-PNT.02, Anexo V). A su vez, las cabinas también tienen indicadores del nivel de saturación del filtro HEPA que avisan de cuando es necesario cambiarlo.



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

A todo operario que va a comenzar a trabajar en el laboratorio NCB3 se le hace entrega de la colección de protocolos normalizados de trabajo, donde puede aprender de una manera específica y concreta todos los pasos a seguir para realizar cualquier trabajo básico dentro del laboratorio. Además, también se le entrega el “Plan de contingencia del laboratorio NCB3” donde aparecen todos los pasos a seguir en caso de riesgo ajeno a él.

El operario firma un escrito donde certifica la lectura y comprensión de los citados documentos, además de responsabilizarse de la información que contienen.

Obviamente, aparte de toda la información escrita se le somete a un entrenamiento y a una evaluación antes de poder empezar a trabajar.

4. Planes de emergencia y contingencia:

Plan de contingencia del laboratorio NCB3 y protocolo normalizado de trabajo 05 y 06 – Derrames e incidentes y Accidentes y emergencias (Anexo V). Ambos protocolos se presentaron en la autorización de la instalación, referencia A/ES/20/I-45.