NOTIFICACIÓN SOBRE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Responsables de la actividad

a. Entidad

Nombre: Centro Nacional de Biotecnología (CNB). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Dirección postal: Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Darwin 3. Campus Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Mario Mellado García

NIF: 13295208N

Cargo: Director del CNB

Tel: 91 585 45 03 / 4852

Correo electrónico: direccion.cnb@csic.es

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Juan Francisco García Arriaza

NIF: 52951803F

Cargo: Científico Titular

Tel: +34915854560

Correo electrónico: jfgarcia@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

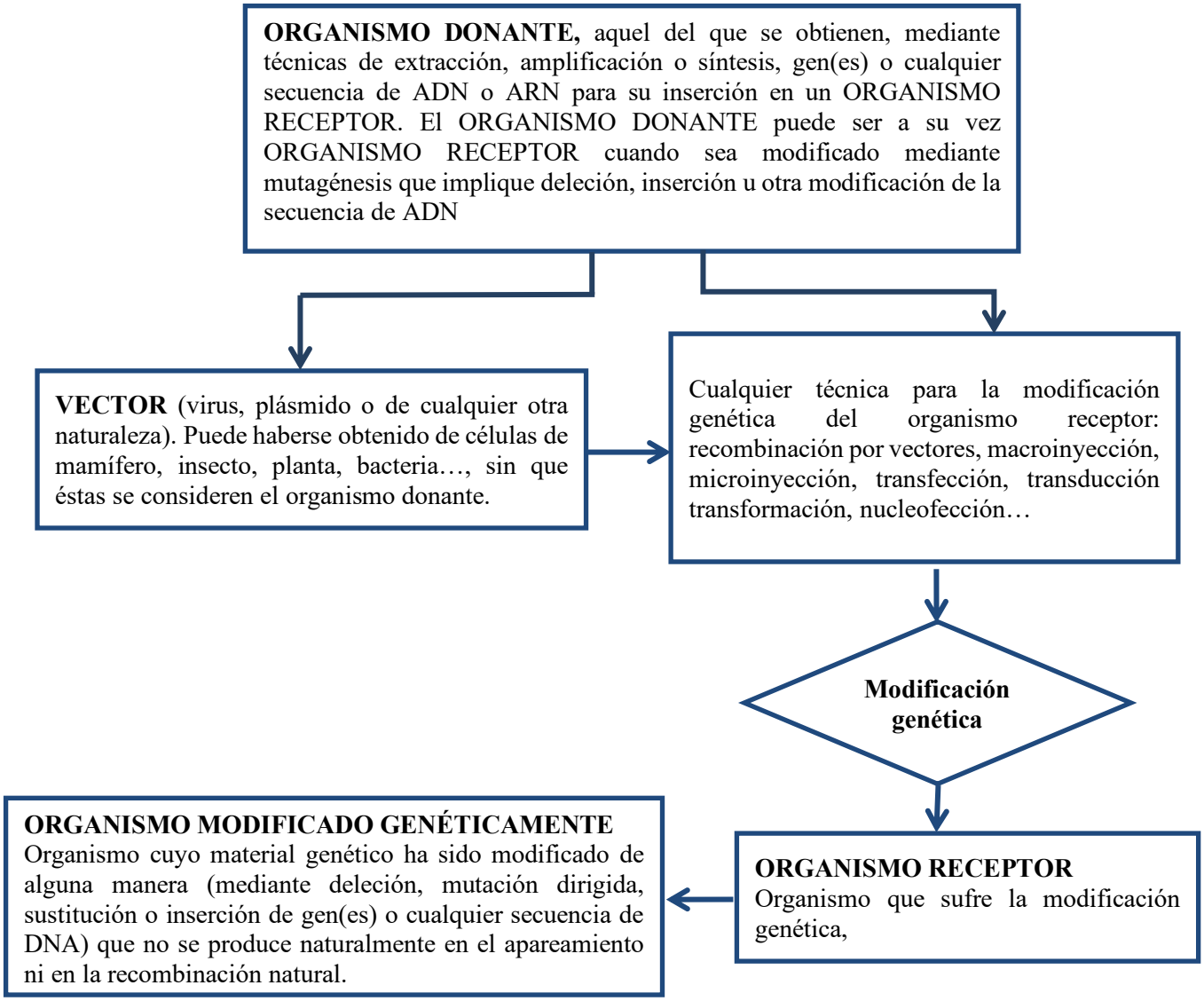
Tel: 91 585 45 41

Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es

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

Fernando Usera Mena

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 especificando[1]**:**

– Nombre de la convocatoria:

Consolidación Investigadora 2022

– Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

CNS2022-135511

– Organismo financiador:

Ministerio de Ciencia e Innovación, Agencia Estatal de Investigación

Otro tipo de financiación[2] ☐

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/00/I-08

– Fecha de autorización de la instalación:

06-marzo-2000

Si el OMG no se genera en la instalación[3]:

– Nombre de la instalación de origen del OMG:

CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CSIC-UAM).

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

A/ES/23/86

[1] **TASAS**
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.

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

[3] Debe 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.

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

A/ES/17/I-22

– 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]:

El tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación y etiquetado seguirán la legislación internacional y nacional vigente para el transporte de material biológico infeccioso para humanos y animales. El transporte del virus recombinante mpox-GFP desde el CBM-CSIC-UAM, donde se ha construido, hasta el CNB-CSIC, donde se realizarán los experimentos in vitro, se llevará a cabo por una empresa autorizada conforme a dicha normativa como material infeccioso de categoría A.

3. Finalidad de la actividad:

Utilización de mpox virus (anteriormente virus de la viruela del mono) expresando la proteína fluorescente EGFP que permita evaluar la capacidad antiviral de nuevos compuestos o fármacos ya existentes o la capacidad neutralizadora de anticuerpos generados por vacunas basadas en MVA.

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:

Animal ☐

[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) Nº 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) Nº** 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) Nº 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

Planta ☐

Bacteria ☐

Hongo ☐

Virus ☒

Protozoos ☐

-Especificar el nombre científico y común:

Mpox virus, virus de la viruela del mono

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

i) Técnicas de aislamiento: Se usó la técnica de aislamiento por plaqueo en monocapas de células BSC40 en medio semisólido para aislar el clon viral inicial con el que se generó el posterior stock de virus.

ii) Técnicas de identificación: i) Visualización directa de las partículas virales de mpox virus por microscopía electrónica tras tinción negativa con acetato de uranilo. ii) Determinación del tamaño y morfología de la placa viral característica formada en monocapas de células BSC-1. iii) Obtención de la secuencia completa por secuenciación masiva (NGS-Illumina) del genoma extraído directamente de partículas virales purificadas por ultracentrifugación en dos gradientes de sacarosa de manera sucesiva.

iii) Marcadores genéticos: PCR convencional específica para diferenciar mpoxv de otras miembros de la familia de los poxvirus como el virus vaccinia o el virus ectromelia.

iv) Marcadores fenotípicos:

v) Estabilidad genética: Secuenciación completa del genoma viral por NGS en 5 sucesivos pases de cultivo celular hasta lograr el stock viral definitivo.

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

SI ☒

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

Se ha realizado la caracterización genómica de las preparaciones de estos stocks virales purificados a partir de cultivos celulares empleando secuenciación masiva o NGS para determinar la totalidad de material genético (DNA y RNA), constatando que no existía otra fuente de este material que no se correspondiese con el DNA del mpox virus modificado. Además, se han realizado pruebas de detección de micoplasma con resultado negativo y se ha examinado la preparación del virus purificado al microscopio electrónico para comprobar el grado de pureza y descartar la presencia de bacterias, protozoos o restos celulares.

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):

Grupo 3

SI ☒

Para:

Humanos	☒
Animales	☒
Plantas	☐
Otros	☐

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

Tras un contacto directo con el virus se producen lesiones cutáneas, inicialmente en la zona de contacto que posteriormente pueden extenderse a otras zonas del cuerpo, acompañados de dolor, fatiga, fiebre, dolor muscular e inflamación de ganglios. Normalmente, la enfermedad se desarrolla en un periodo de 2 a 4 semanas. La gravedad de la enfermedad depende del estado del sistema inmune del sujeto infectado, especialmente grave en aquellos sujetos inmunodeprimidos.

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:

Tenemos la experiencia previa de un estudio durante el reciente brote de mpox en 2022. Nuestro grupo de investigación recibió muestras clínicas de pústulas procedentes de pacientes diagnosticados positivamente para esta enfermedad. En las instalaciones BSL-3 del CNB, aislamos virus procedentes de estas muestras, aislamos y caracterizamos genéticamente un clon infeccioso de mpox virus que crecimos en cultivo celular, siempre en estas instalaciones. Además, nuestra tradicional línea de investigación incluye el estudio de la modulación de la respuesta hospedadora por otro poxvirus del mismo género que mpox virus, como el virus Vaccinia, empleado para la generación de candidatos vacunales. Este aislado del brote de mpox de 2022 está siendo actualmente empleado para realizar diferentes experimentos de neutralización mediante sueros procedentes de diferentes modelos in vivo vacunados con MVA o compuestos antivirales. En resumen, este grupo de investigación tiene amplia experiencia en el trabajo con poxvirus en las instalaciones BSL-3 del CNB y además reciente experiencia en la manipulación y aislamiento de mpox virus.

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:

Falta de humedad, temperatura por encima de los 50ºC, o radiación UVA impactan claramente sobre la viabilidad de mpox virus

iii) Posibles nichos ecológicos:

Mpox virus replica mayoritariamente en órganos linfoides, como los ganglios o el bazo de seres humanos, simios y diversos tipos de roedores. También replica en la dermis dando origen a las pústulas o lesiones cutáneas características. Se transmite entre individuos, principalmente a través del contacto estrecho con las lesiones cutáneas de individuos infectados o la ingesta de animales infectados. También replica en las dermis, en aquellas zonas de contacto.

iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

El periodo de incubación de la enfermedad es de 3-17 días, momento a partir del cual un individuo se considera infeccioso y puede contagiar a otro.

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:

En las zonas endémicas, el virus se transmite de manera natural entre determinados roedores africanos del tipo rata o ardilla produciendo en estos animales síntomas como letargia, pérdida de apetito, fiebre, inflamación de los ganglio o erupciones cutáneas. De manera esporádica, mpox virus es capaz de infectar desde estos roedores a monos y humanos, bien por mordeduras o por ingesta de carne infectada. También se han realizado infecciones experimentales en perritos de las praderas, en los que se ha podido reproducir gran parte de la sintomatología de mpox.

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

Diversos países del África subsahariana. Entre ellos: Benín, Congo, Camerún, Gabón, Sierra Leona, Nigeria, Costa de Marfil, Ghana o República Centroafricana

j. Hábitat natural del organismo:

Áreas de selva tropical de África Central y Oriental

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

Humanos	☐
Animal	☒
Planta	☐
Bacteria	☐
Hongo	☐
Virus	☐
Protozoos	☐

-Especificar el nombre científico y común:

EGFP proviene de la medusa *Aequorea victoria*,

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI ☐ NO ☒

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

SI ☒

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

Se dispone de preparaciones filtradas de DNA del plásmido que contienen la secuencia codificante para EGFP. Esta preparación servirá de molde en las reacciones de PCR para obtener dichos fragmentos, que serán subclonados en el vector de transferencia. El vector se obtiene en cultivos de bacterias, tras procesos de lisis celular, por lo que las preparaciones finales no contienen agentes biológicos contaminantes, ya que se han producido en condiciones de esterilidad, añadiendo un paso de filtración final que impide la presencia de bacterias, hongos y virus.

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.

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 ☐

Animales ☐

Plantas ☐

Otros ☐

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

NO ☒

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

SI ☐ NO ☐

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

DNA codificante (cDNA)

g. Método de obtención:

– Extracción ☐

– PCR ☒

– Síntesis *in vitro* ☐

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

La secuencia a insertar, de manera independiente, codifica para una proteína, que apropiadamente excitada, exhibe propiedades autofluorescentes en un rango de emisión. EGFP, Enhanced Green fluorescent protein (Uniprot - C5MKY7), es una proteína originada a partir de la modificación

de la Green fluorescent protein (UniProtKB - P42212 (GFP_AEQVI)), con la siguiente modificación M1_S2insV/F64L/S65T/H231L y que emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible.

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):

Expresión de la proteína autofluorescente EGFP.

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:

Recombinación homóloga, que implica transfectar con un plásmido de transferencia células infectadas por mpox virus. Este vector de transferencia incluye la secuencia a insertar flanqueada por las regiones de recombinación homóloga FL y FR (ver mapa)

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

SÍ ☒ NO ☐

En caso afirmativo:

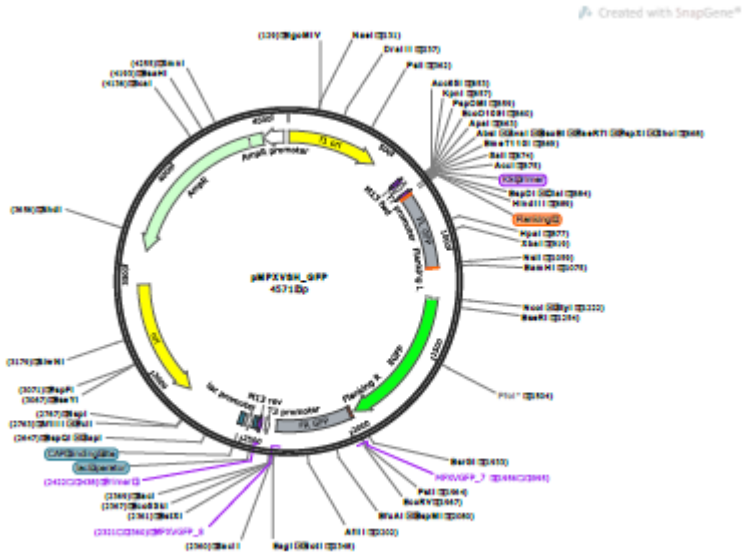
a. Tipo e identidad del vector (plásmido, virus, otros):

Plásmido

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.

Se emplearán el vector pMPXSH_EGFP para generar el mpox virus expresando la proteína fluorescente EGFP. La secuencia codificante para EGFP se amplificaron por PCR y se subclonó en el plásmido pINS mediante digestión con enzimas de restricción en medio de las regiones flanqueantes L y R que representan zonas del genoma del mpox virus. El vector generado porta el gen de resistencia a ampicilina y f1 como origen de replicación en bacterias.

Mapa del vector pMPXSH_EGFP para insertar la secuencia codificante para la proteína autofluorescente EGFP (en mpox virus



ii) Si se trata de virus:

- Es defectivo en replicación SÍ ☐ NO ☐
- 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.

b. Gama de hospedadores del vector:

Bacterias

c. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No contiene

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?

Porta un gen de resistencia a ampicilina

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

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

Las secuencias insertadas no tienen otra función que sus propiedades autofluorescentes

b. Información sobre los genes estructurales:

No contiene

c. Información sobre los elementos reguladores:

No contiene

d. ¿Ha sido secuenciada?

Si, por secuenciación Sanger en el vector

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

No

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 ☐
  - Localización cromosómica:
  - Secuencias colindantes:
  - La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

iii) Se mantiene en forma episómica ☐

- Número de copias:
- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

b. Si el vector es un virus:

i) Se mantiene en forma episómica ☐

ii) Se inserta en el genoma ☐

- La inserción se produce al azar ☐
- La inserción es específica ☐

- Localización cromosómica:

- Secuencias colindantes:

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

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

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

El OMG generado es un mpox virus que expresa independientemente la proteína autofluorescente EGFP. La secuencia codificante correspondiente se ha insertado en medio de un pseudogen (sin expresión), ubicado entre los genes OPG185 y OPG187.

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

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

No

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 son previsibles, dados el sitio de inserción y la secuencia insertada

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

No

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

No

f. Marcadores específicos del OMG:

Proteína verde fluorescente EGFP

3. Información sobre la estabilidad genética previsible del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):

La experiencia pasada nos indica que inserciones de la misma secuencia codificante para EGFP en sitios homólogos del genoma de otros poxvirus altamente emparentados con mpoxv, como el virus vaccinia, o el virus ectromelia, se han mantenido intactas durante años en los cuales se ha propagado el virus en las mismas células descritas para esta utilización.

4. Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos. Justificar:

Nula o muy baja. Este OMG será manipulado exclusivamente siempre dentro de las instalaciones certificadas como BSL-3 por la autoridad competente localizadas en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Además, su manipulación no coincidirá con la de ningún otro patógeno, dado que se realiza en un cuarto aislado de este laboratorio, de uso exclusivo para mpox virus. Además, todos los restos derivados de la infección al finalizar el ensayo será neutralizado y destruido acorde a los protocolos de eliminación de deshechos en este tipo de instalaciones.

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

PCR convencional con oligos específicos para amplificar una región de la secuencia insertadas: EGFP. Además, la modificación realizada, permite distinguir estos OMGs del organismo receptor examinando las células infectadas mediante microscopía de fluorescencia con los filtros específicos para cada espectro de emisión.

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

No hay planificación de asilar este OMG de la naturaleza. En cualquier caso, se podrían usar las técnicas de aislamiento por plaqueo en cultivo celular descritas para el organismo receptor.

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).

El virus mpox expresando la proteína autofluorescente EGFP (MPOXV-EGFP) se va a utilizar para la infección de líneas celulares de mono verde africano (BSC-40 (ATCC CRL-2761) y Vero E6 (ATCC-CRL1586)) para posteriormente determinar el porcentaje de células infectadas a diferentes tiempos post-infección. El OMG generado representa una herramienta biológica, como es la expresión de la proteína fluorescente eGFP, que permite determinar mediante microscopía o citometría de flujo el porcentaje de infección dentro de los cultivos analizados. Este parámetro, nos permitirá evaluar el éxito de drogas o inhibidores que afecten rutas celulares que repercutan en la alteración del normal ciclo celular infectivo del mpox; así como la efectividad de diferentes sueros o sustratos neutralizantes. Igualmente permite la identificación de aquellas células infectadas, es decir, como marcador de infección, en ensayos de microscopía de fluorescencia

ENSAYOS: El uso de este tipo de virus expresando marcadores fluorescentes, es muy común en esta clase de ensayos para la evaluación de la actividad antiviral o en ensayos de neutralización. Los ensayos consistirán en el tratamiento de las líneas celulares detalladas anteriormente con los agentes antivirales o diversos sueros neutralizantes y a continuación infectar estos cultivos con MPOXV-EGFP. Se monitorizará la expresión de EGFP mediante microscopía y/o citometría de flujo para cuantificar el grado de infección del cultivo celular en el(los) momento(s) de interés. Siempre se contará con un cultivo sin infectar y un cultivo infectado en ausencia de inhibidores/antivirales para comparar.

El protocolo de infección para la amplificación inicial del stock virus sería el siguiente:

- Infectar las células con los virus correspondientes a una multiplicidad de infección de 0.01 PFU/célula en un volumen de adsorción de 5 ml de medio sin suero.

- Dejar 1 h en el incubador a 37ºC agitando cada 15 min.

- Retirar inóculo y añadir 20 ml por placa de medio DMEM-2% FBS.

- Dejar 2-3 días en el incubador hasta que el efecto citopático sea completo.

- Recoger y caracterizar. La concentración máxima aproximada a obtener en las amplificaciones será de 10^8 PFU/ml.

Una vez obtenido este stock de trabajo, realizaremos los diferentes experimentos de neutralización o

El protocolo para la neutralización es el siguiente:

Se incubarán sueros o, de igual forma, las diluciones de compuestos antivirales, diluidos en serie en medio DMEM-2% FBS en una proporción de 1:1 con diferentes concentraciones del virus de la viruela del mono en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos durante 1 h a 37 °C. A continuación, se agregarán las mezclas de muestras de sueros/ antivirales y virus por duplicado a monocapas de células BSC-40 o Vero E6 sembradas en placas de 96 pocillos a 20.000 células/pocillo. Las placas selladas y dentro de cajas cerradas, se incuban dentro de un incubador específico para este virus a 37 °C, en CO2 al 5% durante 3 días. Posteriormente, las células se fijan con formaldehído al 10 % o paraformaldehído al 8% durante 30min a temperatura ambiente. Gracias a la expresión de GFP inducida por la replicación del virus MPOX-GFP, podremos cuantificar el grado de infección de las muestras por diferentes técnicas de microscopia de fluorescencia o citometría de flujo. Los títulos de NT50 se calculan como la dilución recíproca que da como resultado una inhibición del 50 % de la intensidad de señal GFP+.

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

0.1 ml con concentración de 10^5 unidades formadoras de placa/ml

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

0.1 y 0.5 ml con concentración de entre 10^5 – 10^9 unidades formadoras de placa/ml

b. Número aproximado de plantas por ensayo:

0

c. Número aproximado de animales por ensayo:

0

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).

5 años. El grupo de investigación tiene vigente un proyecto de investigación (Consolidación Investigadora, CNS2022-135511) cuya fecha de finalización es el 31/08/2025 y es destinatario de un proyecto de investigación europeo que está en proceso de la firma del Grant Agreement de 5 años de duración y que se prevé que empiece en Enero 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.

Las propiedades nocivas del organismo receptor no se verán alteradas en el OMG. El organismo receptor, en el ser humano produce lesiones cutáneas, inicialmente en la zona de contacto que posteriormente pueden extenderse a otras zonas del cuerpo, acompañados de dolor, fatiga, fiebre, dolor muscular e inflamación de ganglios. Normalmente, la enfermedad se desarrolla en un periodo de 2 a 4 semanas. La gravedad de la enfermedad depende del estado del sistema inmune del sujeto infectado, especialmente grave en aquellos sujetos inmunodeprimidos.

b. Organismo donante.

No se espera afectación ninguna. No se trabajará de manera directa con el organismo donante, tan solo con una secuencia codificante para las proteínas fluorescentes a insertar.

c. Inserto.

Dada la naturaleza de la secuencia a insertar, sin ninguna propiedad nociva descrita anteriormente, no se espera que esta secuencia incremente las propiedades nocivas inherentes al organismo receptor.

d. Vector.

No se espera afectación ninguna. El vector no se integra de ningún modo en el organismo receptor. El proceso de generación por recombinación homóloga seguido de una selección dominante transitoria asegura que el clon infeccioso seleccionado finalmente contenga exclusivamente la secuencia de interés a insertar, mientras que el vector es eliminado. Al no integrarse no contribuye.

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG[5]

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

Las mismas que se han descrito para el organismo receptor, el mpox virus.

b. Efectos para el medio ambiente.

Las mismas que se han descrito para el organismo receptor, el mpox virus.

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

1) Infección de cultivos celulares con el OMG: Implica la apertura del tubo que contiene el OMG, la toma del volumen de OMG necesario para infectar la placa que contiene las células, y el transporte de estas placas infectadas de vuelta al incubador.

Para asegurar las condiciones de seguridad biológica necesarias para trabajar dentro de la instalación se seguirán los siguientes procedimientos. Los tubos que contienen el OMG serán de cierre seguro (rosca) y a su vez estarán guardados en un contenedor secundario. Estos contenedores se abrirán siempre dentro de una cabina de seguridad biológica y tras ser descontaminados adecuadamente con Virkon. Así mismo, antes de guardarse, tanto los tubos que contienen el propio OMG, como los contenedores secundarios serán nuevamente descontaminados con Virkon.

2) Examen de los cultivos celulares infectados al microscopio de fluorescencia. Si se realiza dentro de la instalación BSL-3, como control rutinario de la infección, se observará las muestras dentro de los contenedores secundarios empleados para su cultivo tras ser descontaminadas con Virkon. En caso de realizarse esta evaluación fuera del laboratorio BSL-3, a punto final del experimento, las muestras serán previamente fijadas con formaldehido al 10% o paraformaldehído al 8% durante un tiempo mínimo de 30min a temperatura ambiente.

3) Examen de los cultivos celulares en el citómetro de flujo. Estos análisis se realizarán fuera del laboratorio BSL-3, a punto final del experimento; las muestras serán previamente fijadas con formaldehido al 10% o paraformaldehído al 8% durante un tiempo mínimo de 30 mins a temperatura ambiente.

4) Deshecho de las placas infectadas y residuos generados en el proceso. Estos deshechos serán siempre generados dentro de las instalaciones de seguridad biológica BSL-3. Los desechos serán en primer lugar descontaminados químicamente mediante tratamiento con Virkon y, posteriormente, autoclavados antes de ser desechados finalmente.

[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:

Todo el proceso se realizará en el laboratorio BSL-3 del CNB. En concreto para las distintas fases: 1) La infección de las células se realizará en una cabina de bioseguridad de tipo II destinada exclusivamente a la manipulación de mpox virus, situada en un cuarto exclusivo para esa cabina, donde también se encuentra el incubador de células. Las placas, una vez infectadas, se sellarán con cinta aislante para evitar derrames o escape de material contaminado. Este sello evita el intercambio de gases con las células, por lo que se añadirá 10 mM Hepes para tamponar el medio y evitar su acidificación que podría dañar las células. Además, las placas se introducen en una caja cerrada desinfectada para evitar derrames dentro del incubador. 2) El laboratorio BSL-3 del CNB está dotado con un microscopio de fluorescencia para poder visualizar directamente la fluorescencia de las células infectadas con el OMG. Para evitar derrames accidentales durante el trayecto desde la cabina hasta el microscopio, las placas con las células se transportarán en el interior de las cajas cerradas en las que se encuentran en el incubador. Si requerimos realizar algún ensayo de microscopía con equipamiento específico no disponible dentro del laboratorio BSL-3, las muestras serán previamente fijadas con formaldehido al 5% o paraformaldehído al 4% durante al menos 30 minutos a RT. Hemos comprobado experimentalmente que a esta concentración y tiempo la fijación inactiva el mpox virus y otros poxvirus. 3) Para analizar las células infectadas por el OMG por citometría de flujo, las muestras serán fijadas en 4% de paraformaldehído durante 30 minutos. Las muestras fijadas e inactivadas se desinfectarán exteriormente y pasarán del laboratorio BSL-3 al BSL-2 para su análisis en el citómetro de flujo. 4) Todos los deshechos de materiales biológicos o no biológicos serán inactivados acorde a los protocolos reflejados en el manual de bioseguridad de esta esta instalación

VIII. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA[6]

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:

[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.

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 los sistemas de confinamiento y protección:

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 verificación y validación de los sistemas de confinamiento y protección:

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 de las normas de control de acceso, manipulación, descontaminación, esterilización, sanitización, etc. según se indica en diferentes apartados del citado Reglamento.

IX. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1. Encargado de la gestión de residuos:

a. Gestión interna: SÍ ☒ NO ☐

– Método de inactivación, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados:

Todo lo concerniente a la gestión de los residuos generados se especifica en los apartados 4.F y 6.H del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

b. Gestión por una empresa externa: SÍ ☒ NO ☐

– Nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:

CONSENUR

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA

1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

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

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Viene indicado en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

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

Documentación: - Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios del CNB. - Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos "in vitro" de nivel 3 de contención biológica del CNB. - Procedimientos Normalizados de Trabajo del Servicio de Bioseguridad del CNB.

Cursos y seminarios:

- Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Bioseguridad del CNB.

- Seminarios específicos sobre el Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos "in vitro" de nivel 3 de contención biológica del CNB.

4. Planes de emergencia y contingencia:

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