



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

**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](mailto:direccion@cnb.csic.es)

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: [Pablo Gastaminza Landart](#)

NIF: [44145453N](#)

Cargo: [Investigador Distinguido](#)

Tel: [91 585 4678](#)

Fax: [91 585 4506](#)

Correo electrónico: [pgastaminza@cnb.csic.es](mailto:pgastaminza@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](mailto: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 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

Actividad financiada por el Plan Estatal de Investigación Científica SAF2017-87846-R

- 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:

Producción segura de virus infecciosos recombinantes de la fiebre del Nilo Oriental (WNV) a partir de su genoma (cDNA clonado), con objeto de estudiar aspectos básicos de su biología, incluyendo los factores celulares y virales que regulan la infección por WNV en cultivo celular. Dicho genoma está basado en una cepa (WN 956 D117 3B; linaje II) aislada de un paciente.

No se plantea modificar genéticamente ningún organismo, sino producir un virus recombinante con un gen marcador correspondiente a la proteína verde fluorescente (GFP) para su uso confinado en tareas de investigación biomédica en cultivo celular. En concreto, se empleará un plasmido bacteriano (pWNVII-GFP), previamente generado por otro laboratorio, que contiene la secuencia completa del genoma viral en un vector (pBR322) que permite su transcripción in vitro para la producción de genomas virales completos en forma de RNA desnudo. Dicho material genético permitirá simular una infección viral mediante su introducción en células susceptibles que producirán el virus infeccioso recombinante. Por lo tanto, en esta propuesta se considerará el WNV como organismo receptor que ha sido insertado en un plásmido bacteriano.

La construcción plasmídica descrita aquí (pWNVII-GFP) ha sido generada con anterioridad. El proceso se describe en detalle en Pierson et al. 2005 (PMID: 15749120) y ha sido empleado para rescatar virus recombinantes en diversos laboratorios NCB3 en el mundo.

- 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

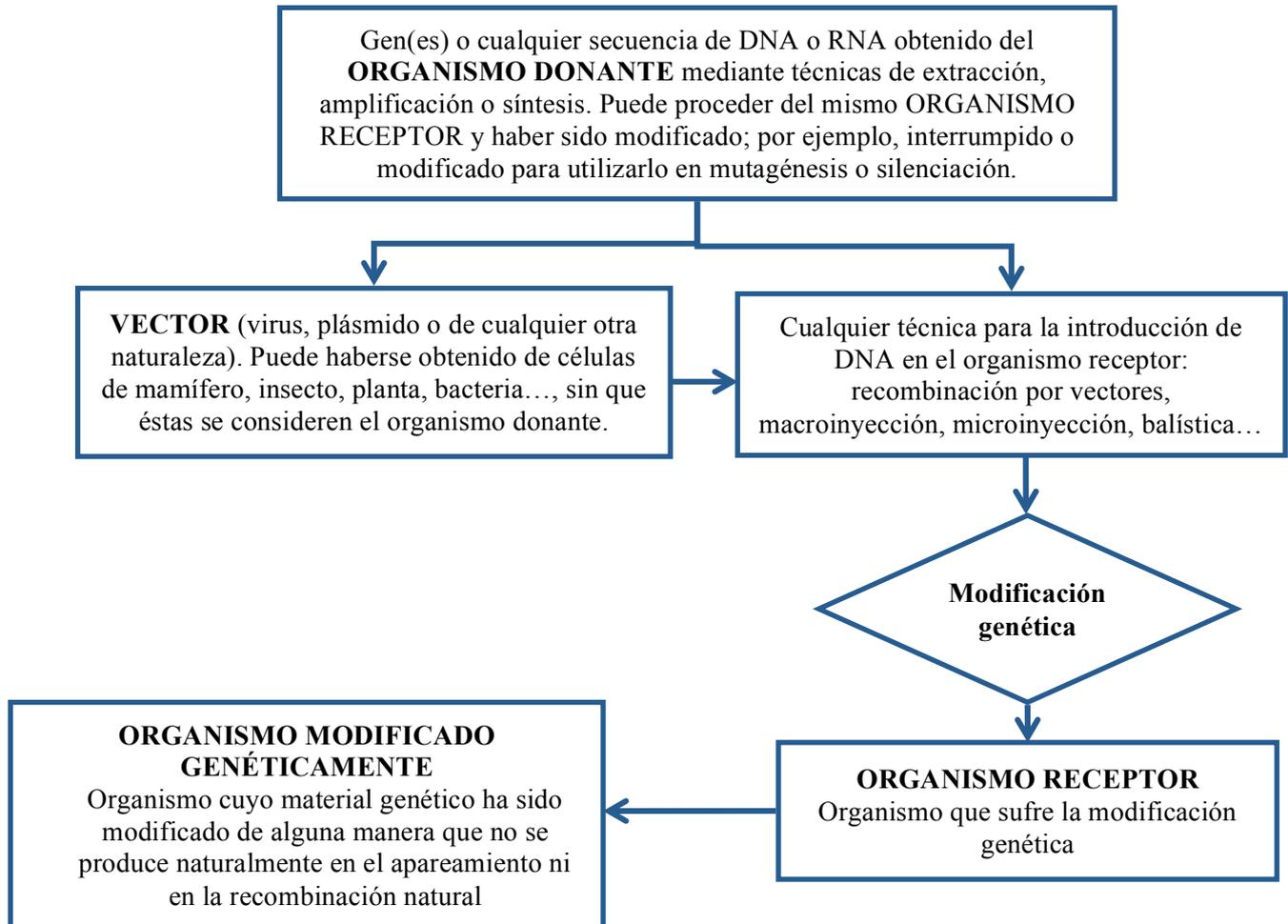
Tipo 2

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:

Taxonomía: Flaviviridae; Flavivirus; virus de la fiebre del Nilo Occidental

Nombre común: virus de la fiebre del Nilo Occidental

Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

El WNV puede ser aislado de diversos tejidos de humanos y animales infectados, así como de mosquitos transmisores de la enfermedad mediante técnicas virológicas convencionales en cultivo celular. Para su identificación inequívoca se requieren técnicas de biología molecular.

b) Técnicas de identificación:

Mediante transcripción inversa y PCR de tejidos o cultivos infectados. Adicionalmente técnicas de inmunomarcaje con anticuerpos específicos frente a proteínas virales para Western-Blot, inmunomicroscopía y ELISA.

c) Marcadores genéticos:

Se dispone de la secuencia completa del organismo receptor.

d) Marcadores fenotípicos:

El virus produce efecto citopático en los cultivos celulares infectados. La presencia de virus puede medirse mediante ensayo de placa convencional en cultivo celular.

e) Estabilidad genética:

La típica de virus de genoma de RNA. Se trata de virus con elevada tasa de variabilidad genética. En el caso de la propagación en cultivo celular, su adaptación suele resultar en atenuación en hospedadores naturales. De cualquier forma se observarán las precauciones adecuadas para minimizar la adaptación del virus.

2) Posibles modificaciones genéticas anteriores: **No se han descrito.**

3) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI  NO

4) 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:



El virus es potencialmente patogénico para humanos y animales como pájaros y algunos mamíferos salvajes. Infecta asintómicamente a mosquitos. Existen modelos animales en ratón para la infección con WSN.

- 5) 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.*):

El virus de la fiebre del Nilo Occidental ha sido asignado al grupo de riesgo 3.

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

La mayoría de las infecciones humanas son asintomáticas. En 1999, durante uno de los brotes recientes más importantes descritos en población humana, una encuesta reveló que solo el 20% de las personas seropositivas WNV en Nueva York reportaron síntomas consistentes con la fiebre WNV; aproximadamente la mitad había visitado a un médico en el momento de la enfermedad.

La mayoría de los casos clínicos de infecciones por WNV son leves y presentan síntomas parecidos a la gripe, que incluyen fiebre, dolor de cabeza y dolores en el cuerpo. También se observan debilidad, malestar, anorexia, linfadenopatía, náuseas y vómitos. En ocasiones se desarrolla una erupción cutánea maculopapular o morbiliforme eritematosa en el cuello, el tronco, los brazos o las piernas. La mayoría de las infecciones no complicadas se resuelven en 3-6 días.

En casos más severos, puede haber signos de encefalitis, meningoencefalitis o meningitis. Los síntomas pueden incluir fiebre alta, dolor de cabeza, rigidez en el cuello, estupor, desorientación, temblores, convulsiones, debilidad muscular severa, parálisis flácida y coma. También se han observado ataxia, anomalías del nervio craneal, mielitis, dolor ocular, polirradiculitis y convulsiones. En algunos brotes, ocurren miocarditis, pancreatitis y hepatitis fulminante. Se estima que 1 de 140 a 320 infecciones produce meningitis o encefalitis.

La tasa de letalidad en pacientes con enfermedad neuroinvasiva oscila entre el 4% y el 14%; puede alcanzar 15-29% en pacientes mayores de 70 años. Existe evidencia de que la enfermedad concurrente, como la diabetes o la inmunosupresión, aumenta el riesgo de muerte. Los pacientes gravemente enfermos pueden sufrir una morbilidad sustancial a largo plazo después de la recuperación; fatiga, pérdida de memoria, dificultad para caminar, debilidad muscular y depresión han sido reportados.

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

SI  NO

Porqué:



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

Si

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

El solicitante cuenta con más de 20 años de experiencia en manipulación de virus patógenos humanos en cultivo celular, incluyendo estudios de genética reversa y patogénesis, primero con el virus de la gripe y actualmente con el virus de la hepatitis C. El solicitante es autor de uno de los trabajos que permitió el desarrollo de un sistema de infección para el virus de la hepatitis C en cultivo celular basado en un virus recombinante. Dado que dicho virus es de la misma familia que el virus en cuestión y que su producción y manejo son semejantes, dicha experiencia es garantía de buenas prácticas. Cabe destacar que solicitante no trata de rescatar un virus nuevo, con propiedades desconocidas, sino el de recibir autorización para desarrollar actividades que se han desarrollado en otros laboratorios desde hace más de una década.

8) 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?: NO

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

- i) esporas
- ii) endosporas
- iii) quistes
- iv) esclerocios
- v) esporas asexuales (hongos)
- vi) esporas sexuales (hongos)
- vii) otros, especifíquese

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia: Presencia de comunidades de mosquitos.

d) Posibles nichos ecológicos: Mosquitos, pájaros salvajes y mamíferos salvajes.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: No definido

9) Efectos posibles sobre el medio ambiente:



- a) Implicaciones en procesos ambientales (*p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo*): **No aplica**
- b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos: **infecta humanos, aves, algunos mamíferos salvajes y mosquitos**
- 10) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor: **Global**
- 11) Hábitat natural del organismo: **preferentemente zonas tropicales y subtropicales. Asociado a presencia del vector.**

#### **IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE**

- 1) Nombre científico: ***Renilla reniformis***

Taxonomía: **Reino: Animalia Filo: Cnidaria Clase: Anthozoa Subclase: Octocorallia Orden: Pennatulacea Familia: Renillidae**

Nombre común: **Pensamiento de mar.**

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

- 3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in Vitro*

- 4) Función del gen/genes en el organismo donante: **Expresión de proteína fluorescente verde (GFP).**

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

SI  NO

- a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i) seres humanos

ii) animales

iii) plantas



- b) ¿De qué 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.**
- 6) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural? **No.**

## V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

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

2) Finalidad de la modificación genética:

**Producción segura de virus recombinante monoclonal bicistrónico portador de un gen marcador (GFP) para visualizar células infectadas en un sistema de cultivo celular.**

2) Método utilizado para llevar a cabo la modificación genética: **Clonaje mediante RT-PCR**

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

SÍ  NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector: **Plásmido bacteriano pBR322.**

b) Si se trata de un virus:

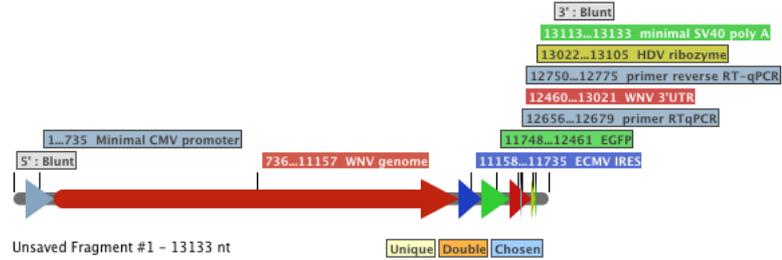
Es defectivo en replicación SÍ  NO

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*):





Restriction map of Unsaved Fragment #1 - 13133 nt  
<Serial Cloner V2.5> -- <Aug 28, 2018 12:38 PM>



FEATURES	Location/Qualifiers
CDS	11748..12461 /label=EGFP /SerialCloner_Color=&h32CD32 /SerialCloner_Show=True /SerialCloner_Protect=False /SerialCloner_Arrow=True
promoter	1..735 /label=Minimal CMV promoter /SerialCloner_Color=&h84A4C0 /SerialCloner_Show=True /SerialCloner_Protect=False /SerialCloner_Arrow=True
terminator	13022..13105 /label=HDV ribozyme /SerialCloner_Color=&hBDC00F /SerialCloner_Show=True /SerialCloner_Protect=True /SerialCloner_Arrow=True
misc_feature	13113..13133 /label=minimal SV40 poly A /SerialCloner_Color=&h19C019 /SerialCloner_Show=True /SerialCloner_Protect=False /SerialCloner_Arrow=True
misc_feature	736..11157 /label=WNV genome



```

/SerialCloner_Color=&hC0230F
/SerialCloner_Show=True
/SerialCloner_Protect=True
/SerialCloner_Arrow=True
misc_feature 12460..13021
/label=WNV 3'UTR
/SerialCloner_Color=&hC01510
/SerialCloner_Show=True
/SerialCloner_Protect=True
/SerialCloner_Arrow=True
misc_feature 11158..11735
/label=ECMV IRES
/SerialCloner_Color=&h1D3DC0
/SerialCloner_Show=True
/SerialCloner_Protect=True
/SerialCloner_Arrow=True
misc_feature 12656..12679
/label=primer RTqPCR
/SerialCloner_Color=&h84A4C0
/SerialCloner_Show=True
/SerialCloner_Protect=True
/SerialCloner_Arrow=True
misc_feature 12750..12775
/label=primer reverse RT-qPCR
/SerialCloner_Color=&h84A4C0
/SerialCloner_Show=True
/SerialCloner_Protect=True
/SerialCloner_Arrow=True

```

ORIGIN

```

1 TCAATATTGG CCATTAGCCA TATTATTCAT TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA
61 TTGGCCATTG CATACTTGTG ATCTATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG GCTCATGTCC
121 AATATGACCG CCATGTTGGC ATTGATTATT GACTAGTTAT TAATAGTAAT CAATTACGGG
181 GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT CCGCGTTACA TAACCTACGG TAAATGGCCC
241 GCCTGGCTGA CCGCCCAACG ACCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT
301 AGTAACGCCA ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAACACTGC
361 CCATTGGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTCCG CCCCTATTG ACGTCAATGA
421 CGGTAATGG CCCGCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTACGGGACT TTCCTACTTG
481 GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTT GGCAGTACAC
541 CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC CCATTGACGT
601 CAATGGGAGT TTGTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CAAAATGTC GTAATAACCC
661 CGCCCCGTTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC
721 TCGTTTAGTG AACCGAGTAG TTCGCCTGTG TGAGCTGACA AACTTAGTAG TGTTTGTGAG
781 GATTAACAAC AATTAACACA GTGCGAGCTG TTTCTTGGA CGAAGATCTC GATGTCTAAG
841 AAACCAGGAG GGCCCGGTAA AAACCGGGCT GTCAATATGC TAAAACGCGG TATGCCCCGC
901 GGATTGTCCT TGATAGGACT AAAGAGGGCT ATGCTGAGTC TGATTGACGG GAAGGGCCCCA
961 ATACGTTTCG TGTTGGCTCT TTTGGCGTTT TTCAGATTCA CTGCAATCGC TCCGACTCGT
1021 GCGGTGCTGG ACAGATGGAG AGGCGTCAAC AAACAAACAG CAATGAAGCA TCTCTTGAGT
1081 TTCAAGAAAG AACTAGGAAC TCTGACCAGT GCCATCAACC GCCGGAGCAC AAAACAAAAG
1141 AAAAGAGGAG GCACAGCGGG CTTTACTATC TTGCTTGGGC TGATCGCCTG TGCTGGAGCT
1201 GTGACCTTCT CGAACTTCCA GGGCAAAGTG ATGATGACAG TCAATGCAAC CGATGTCACT
1261 GACGTGATTA CCATTCCAAC AGCTGCTGGG AAAAACCTGT GCATCGTAAG GGCTATGGAC
1321 GTAGGATACC TTTGTGAGGA TACTATCACT TATGAATGTC CGGTCCTAGC TGCTGGAAAT
1381 GACCCTGAAG ACATTGACTG CTGGTGCACG AAATCATCTG TTTACGTGCG CTATGGAAGA

```



1441 TGCACAAAAA CTCGGCATT CCGTCGAAGC AGAAGGTCTC TGACAGTCCA GACACATGGA  
1501 GAAAGTACAC TGGCCAACAA GAAAGGAGCT TGGTTGGACA GCACAAAAGC CACGAGATAT  
1561 CTGGTGAAGA CAGAATCATG GATACTGAGA AACCCGGGCT ACGCCCTCGT TGCAGCTGTC  
1621 ATTGGATGGA TGCTAGGAAG CAACACAATG CAACGCGTCG TGTTTGCCAT TCTATTGCTC  
1681 CTGGTGGCAC CAGCATACAG CTTCAACTGT TTAGGAATGA GTAACAGAGA CTTCTGGAG  
1741 GGAGTGTCTG GAGCTACATG GGTGATCTG GTACTGGAAG GCGATAGTTG TGTGACCATA  
1801 ATGTCAAAAG ACAAGCCAAC CATTGATGTC AAAATGATGA ACATGGAAGC AGCCAACCTC  
1861 GCAGATGTGC GCAGTACTG TTACCTAGCT TCGGTCAGTG ACTTGTAAC AAGAGCTGCG  
1921 TGTCCAACCA TGGGTGAAGC CCACAACGAG AAAAGAGCTG ACCCCGCCTT CGTTTGCAAG  
1981 CAAGGCGTTG TGGACAGAGG ATGGGGAAAT GGCTGCGGAC TGTTTGGA AAA GGGGAGCATT  
2041 GACACATGTG CGAAGTTTGC CTGTACAACC AAAGCAACTG GATGGATCAT CCAGAAGGAA  
2101 AACATCAAGT ATGAGGTTGC CATATTTGTG CATGGCCCGA CGACCGTTGA ATCTCATGGC  
2161 AAGATAGGGG CCACCCAGGC TGAAGATTC AGTATAACTC CATCGGCGCC ATCTTACACG  
2221 CTAAAGTTGG GTGAGTATGG TGAGGTTACG GTTGATTGTG AGCCACGGTC AGGAATAGAC  
2281 ACCAGCGCCT ATTACGTTAT GTCAGTTGGT GAGAAGTCCT TCCTGGTTCA CCGAGAATGG  
2341 TTTATGGATC TGAACCTGCC ATGGAGCAGT GCTGGAAGCA CCACGTGGAG GAACCCGGAA  
2401 AACTGATGG AGTTTGAAGA ACCTCATGCC ACCAAACAAT CTGTTGTGGC TCTAGGGTCG  
2461 CAGGAAGGTG CGTTGCACCA AGCTCTGGCC GGAGCGATTC CTGTTGAGTT CTCAAGCAAC  
2521 ACTGTGAAGT TGACATCAGG ACATCTGAAG TGTCGGGTGA AGATGGAGAA GTTGCAGCTG  
2581 AAGGGAACAA CATATGGAGT ATGTTCAAAA GCGTTCAAAT TCGCTAGGAC TCCCGCTGAC  
2641 ACTGGCCACG GAACGTTGGT GTTGAAGTCA CAATATAACG GAACAGACGG TCCCTGCAAA  
2701 GTGCCCATTT CTTCCGTAGC TTCCCTGAAT GACCTCACAC CTGTTGGAAG ACTGGTGACC  
2761 GTGAATCCAT TTGTGTCTGT GGCCACAGCC AACTCGAAGG TTTTGATTGA ACTCGAACCC  
2821 CCGTTTGGTG ACTCTTACAT CGTGGTGGGA AGAGGAGAAC AGCAGATAAA CCATCACTGG  
2881 CACAAATCTG GGAGCAGCAT TGGAAAGGCC TTTACCACCA CACTCAGAGG AGCTCAACGA  
2941 CTCGCAGCTC TTGGAGATAC TGCTTGGGAT TTTGGATCAG TTGGAGGGGT TTTACCTCA  
3001 GTGGGGAAAG CCATACACCA AGTCTTTGGA GGAGCTTTTA GATCACTCTT TGGAGGGATG  
3061 TCCTGGATCA CACAGGGACT TCTGGGAGCT CTTCTGTTGT GGATGGGAAT CAATGCCCGT  
3121 GACAGGTCAA TTGCTATGAC GTTCTTTCG GTTGGAGGAG TTTTGCTCTT CTTTTCGGTC  
3181 AACGTCCATG CTGACACAGG CTGTGCCATT GATATTGGCA GGCAAGAGCT CCGGTGCGGA  
3241 AGTGGAGTGT TTATCCACAA CGATGTGGAA GCCTGGATGG ATCGTTACAA GTTCTACCCG  
3301 GAGACGCCAC AGGGCCTAGC AAAAATTATC CAGAAAGCAC ATGCAGAAGG AGTCTGCGGC  
3361 TTGCGTTCCG TTTCCAGACT CGAGACCAA ATGTGGGAAG CCATTAAGGA TGAGCTGAAC  
3421 ACCCTGTTGA AAGAGAATGG AGTCGACTTG AGTGTCTGG TGGAAAACA GAATGGGATG  
3481 TACAAAGCAG CACCAAAACG TTTGGCTGCC ACCACGAAA AACTGGAGAT GGGTTGGAAG  
3541 GCTTGGGGCA AGAGTATCAT CTTTGCGCCA GAAGTAGCTA ACAACACCTT TGTCATCGAC  
3601 GGTCTTGAGA CTGAGGAATG CCCAACGGCC AACCGAGCAT GGAACAGTAT GGAGGTAGAG  
3661 GACTTTGGAT TTGGACTGAC AAGCACTCGC ATGTTCTGA GGATTCGGGA AACGAACACA  
3721 ACGGAATGCG ACTCGAAGAT CATAGGAACC GCCGTCAAGA ACAACATGGC TGTGCATAGT  
3781 GATCTATCAT ACTGGATAGA GAGCGGACTC AACGACACCT GGAAGCTTGA GAGGGCGGTT  
3841 CTAGGAGAAG TCAAATCATG CACCTGGCCA GAAACCCACA CTCTGTGGGG TGATGGAGTT  
3901 CTGAAAAGTG ATCTCATCAT ACCCATCACC TTGGCAGGAC CCAGAAGCAA CCACAACAGG  
3961 AGACCAGGGT ACAAACCTCA GAACCAAGGC CCATGGGATG AGGGGCGCGT CGAGATTGAC  
4021 TTTGACTATT GCCCAGGAAC AACAGTAACT ATAAGTGACA GTTGCGAACA CCGTGGACCT  
4081 GCGGCACGCA CAACCACTGA GAGTGGGAAG CTCATCACAG ACTGGTGCTG CAGAAGTTGC  
4141 ACCCTCCCTC CACTGCGCTT CCAGACTGAG AATGGCTGTT GGTATGGAAT GGAAATTCGA  
4201 CCTACGCGGC ACGACGAAAA GACCCTCGTG CAATCGAGAG TGAATGCATA CAACGCCGAC  
4261 ATGATTGATC CTTTTAGTT GGGCCTTATG GTCGTGTTCT TGGCCACCCA GGAGGTCTT  
4321 CGCAAGAGGT GGACGGCCAA GATCAGCATT CCAGCTATCA TGCTTGCACT CCTAGTCTTA  
4381 GTGTTTGGGG GTATTACGTA CACTGATGTC CTGCGATATG TCATTCTCGT CGGCGCCGCG  
4441 TTTGCTGAAG CAAACTCAGG AGGAGACGTC GTGCACTTGG CACTTATGGC TACATTCAAG  
4501 ATTCAACCAG TCTTTCGTT GGCTTCCTTT TTGAAGGCAA GGTGGACCAA CCAAGAGAGT  
4561 ATTTTGCTCA TGCTTGACG TGCTTCTTTC CAAATGGCTT ACTATGACGC CAAGAATGTT



4621 CTGTCATGGG AAGTGCCTGA CGTTTTGAAC TCTCTCTCCG TTGCGTGGAT GATTCTCAGA  
4681 GCTATAAGCT TCACCAACAC TTCAAATGTG GTGGTGCCGC TGCTGGCCCT TTTGACACCT  
4741 GGATTGAAAT GCTTAAACCT TGATGTGTAC AGAATTTTGC TACTCATGGT TGGAGTTGGA  
4801 AGCCTCATCA AAGAAAAAAG GAGCTCTGCA GCAAAAAAGA AAGGAGCTTG CCTCATCTGC  
4861 CTAGCGCTGG CGTCTACAGG AGTGTTCAAT CCAATGATAC TTGCAGCTGG GCTAATGGCT  
4921 TGCGACCCCA ACCGCAAGCG GGGCTGGCCT GCTACAGAAG TGATGACTGC AGTTGGACTC  
4981 ATGTTTGCCA TCGTTGGGGG TCTGGCAGAA CTTGACATAG ATTCTATGGC TATCCCCATG  
5041 ACCATCGCCG GACTTATGTT CGCGGCATTT GTCATCTCTG GAAAGTCAAC AGACATGTGG  
5101 ATTGAGAGGA CGGCTGACAT TACTTGGGAG AGTGATGCTG AAATCACAGG CTCTAGCGAA  
5161 AGAGTAGATG TGAGGCTGGA TGATGATGGA AATTTTCAAC TGATGAATGA CCCCAGGGCA  
5221 CCATGGAAAA TTTGGATGCT TAGGATGGCC TGCCTGGCGA TAAGTGCCTA CACACCTTGG  
5281 GCAATTCTCC CCTCGGTCAT CGGATTCTGG ATAACCCTTC AGTACACAAA GAGAGGAGGT  
5341 GTTCTTTGGG ACACACCATC ACCCAAGGAG TACAAGAAGG GTGATACCAC CACTGGCGTT  
5401 TACAGAATCA TGACTCGAGG TCTGCTTGGC AGTTACCAAG CTGGAGCCGG AGTGATGGTA  
5461 GAGGGGGTGT TCCACACACT ATGGCACACC ACTAAGGGAG CTGCTCTCAT GAGTGGTGAG  
5521 GGACGTCTGG ATCCCTACTG GGGGAGCGTG AAAGAGGACC GACTTTGCTA TGGGGGGCCA  
5581 TGGAAACTCC AACATAAATG GAATGGACAT GATGAGGTCC AAATGATTGT CGTGGAGCCA  
5641 GGGAAAAATG TGAAAAACGT CCAGACCAAG CCCGGAGTGT TTAAGACACC AGAAGGAGAA  
5701 ATTGGGGCAG TTACGCTAGA CTATCCTACC GGAACGTCAG GTTCCCCCAT TGTAGACAAA  
5761 AATGGAGATG TGATTGGATT GTATGGGAAC GCGTCATCA TGCCTAATGG TTCATACATA  
5821 AGCGCCATTG TGCAAGGAGA GAGAATGGAA GAACCGGCAC CAGCTGGCTT CGAACCTGAA  
5881 ATGTTGAGGA AGAAACAGAT CACTGTCCTT GATCTGCACC CCGGAGCAGG AAAGACACGC  
5941 AAGATACTTC CCCAAATCAT CAAGGAGGCC ATCAACAAAA GATTGAGGAC GGCTGTGCTG  
6001 GCACCCACCA GGGTCGTTGC TGCTGAGATG TCTGAGGCC TGAGAGGACT TCCCATTCGG  
6061 TACCAAACCT CAGCAGTGCA CAGAGAGCAC AGTGGAAATG AGATCGTTGA TGTCATGTGC  
6121 CATGCCACCC TCACACACAG GCTGATGTCT CCACACAGAG TCCCCAATA CAACCTGTTT  
6181 ATAATGGATG AAGCCCATTT CACGGATCCA GCGAGCATCG CAGCCAGAGG ATACATAGCA  
6241 ACCAAGGTTG AATTGGGCGA AGCCGCCGCG ATTTTCATGA CGGCAACGCC ACCCGGGACT  
6301 TCTGACCCCT TTCCAGAGTC TAATGCTCCT ATCTCGGACA TGCAAACAGA GATCCCAGAC  
6361 AGAGCCTGGA ACACTGGATA TGAATGGATA ACTGAGTATG TTGGAAAGAC CGTTTGGTTT  
6421 GTTCCAAGTG TGAAAATGGG AAATGAGATT GCCCTCTGTC TGCAACGGGC GGGGAAGAAG  
6481 GTTATCCAGC TGAACAGAAA GTCCATATGAG ACAGAGTACC CCAAGTGTA GAACGATGAT  
6541 TGGGATTTTG TCATCACCAC AGACATATCA GAAATGGGAG CCAACTTCAA GGCGAGCAGA  
6601 GTGATCGACA GCCGCAAAAG CGTGAAACCC ACCATCATTG AGGAAGGTGA TGAAGAGTC  
6661 ATCCTGGGGG AACCTCAGC CATCACGGCT GCCAGCGCTG CTCAGCGGAG AGGACGCATA  
6721 GGAAGAAACC CATCACAAGT TGGTGATGAG TATTGCTATG GAGGGCACAC AAATGAGGAT  
6781 GATTCCAACT TTGCTCACTG GACAGAGGCT CGCATCATGC TAGACAACAT CAACATGCCG  
6841 AATGGTCTGG TGGCTCAACT ATATCAGCCT GAGCGCGAGA AGGTGTACAC CATGGACGGG  
6901 GAATACAGGC TCAGAGGGGA AGAACGGAAG AACTTCCTTG AATTCCTGAG AACAGCTGAT  
6961 TTACCAGTCT GGCTCGCTTA CAAAGTGGCA GCAGCAGGAA TATCATACCA TGACCGGAAA  
7021 TGGTGCTTTG ATGGACCTCG AACCAACACG ATTCCTGAAG ACAACAATGA AGTTGAAGTC  
7081 ATCACGAAGT TGGGTGAGAG AAAGATCCTA AGACCCAGGT GGGCAGATGC TAGAGTGTAC  
7141 TCAGACCATC AAGCTCTAAA GTCCTTCAA GATTTTGCAT CGGGGAAACG ATCACAAATC  
7201 GGGCTCGTTG AGGTGCTCGG GAGAATGCCT GAACACTTCA TGGTGAAAAC TTGGGAGGCA  
7261 TTGGACACGA TGTATGTGGT GGCAGCCGCT GAAAAAGGAG GCCGAGCTCA CAGGATGGCT  
7321 CTTGAGGAGC TACCGGACGC CCTTCAGACA ATAGTTTTGA TTGCACTATT GAGTGTGATG  
7381 TCCTTAGGTG TGTTTTTTCT ACTCATGCAA AGGAAGGGCA TTGGTAAGAT TGGCTTGGGA  
7441 GGAGTAATCT TAGGAGCTGC CACATTCTTC TGCTGGATGG CTGAAGTCCC AGGAACGAAA  
7501 ATAGCAGGCA TGCTCCTGCT TTCCCTGCTG CTCATGATTG TTTTGTATTCC GGAGCCGGAA  
7561 AAGCAGCGCT CACAGACTGA TAACCAGCTC GCCGTGTTCT TGATCTGTGT GCTCACACTG  
7621 GTCGGCGCCG TGGCTGCCAA TGAAATGGGC TGGCTGGACA AGACCAAGAA TGACATTGGC  
7681 AGCCTGTTGG GGCACAGGCC AGAAGCTAGA GAGACGACC TGGGAGTTGA GAGCTTCTTA  
7741 CTTGATCTGC GGCCGGCCAC GGCATGGTGC CTCTATGCC TAACGACAGC CGTTCTCACC



7801 CCTTTGCTGA AGCATCTAAT CACGTCAGAC TACATCAACA CTTCGTTGAC CTCAATAAAC  
7861 GTCCAAGCCA GCGCGTTGTT CACTTTGGCC AGAGGCTTCC CTTTTGTGGA CGTTGGTGTG  
7921 TCAGCTCTCT TGCTGGCGGT CGGGTGCTGG GGTCAGGTGA CTCTGACTGT GACTGTGACT  
7981 GCAGCTGCTC TGCTCTTTTG CCACTATGCT TACATGGTGC CAGGCTGGCA AGCGGAAGCC  
8041 ATGCGATCTG CCCAGCGGCG GACAGCTGCT GGCATCATGA AAAATGTAGT GGTGGATGGG  
8101 ATCGTGGCCA CTGATGTACC TGAACTTGAA CGAACAACTC CAGTCATGCA GAAAAAAGTT  
8161 GGACAGATCA TATTGATCTT GGTATCAATG GCCGCGGTGG TCGTCAATCC ATCAGTGAGA  
8221 ACCGTCAGAG AGGCCGGAAT TCTGACTACA GCAGCAGCAG TCACCCTATG GGAGAATGGT  
8281 GCTAGTTCAG TGTGGAATGC AACGACAGCT ATTGGCCTTT GTCACATCAT GCGAGGAGGA  
8341 TGGCTCTCGT GTCTCTCCAT CATGTGGACT CTCATCAAAA ACATGGAGAA ACCAGGCCCTC  
8401 AAGAGGGGTG GAGCCAAAGG ACGCACGCTA GGGGAAGTTT GGAAGGAGAG ACTCAACCAC  
8461 ATGACGAAGG AAGAAATTTAC CAGATACAGA AAAGAAGCCA TCACTGAAGT TGACCGCTCC  
8521 GCAGCAAAAC ATGCTAGGAG AGAGGGAAAC ATCACTGGAG GCCACCCAGT CTCACGGGGA  
8581 ACCGCGAAAT TACGGTGGTT AGTGGAAGG CGTTTCCTCG AGCCAGTGGG AAAGGTTGTG  
8641 GATCTCGGGT GTGGTAGAGG CGGCTGGTGC TATTACATGG CTACCCAGAA GAGGGTACAG  
8701 GAAGTGAAAG GGTACACGAA AGGAGGACCT GGCCATGAAG AACCACAAC TGGTCAGAGC  
8761 TATGGTTGGA ATATTGTTAC CATGAAGAGT GGAGTCGACG TCTTCTACAG ACCATCAGAA  
8821 GCGAGCGACA CACTGCTCTG TGACATTGGA GAGTCATCGT CAAGTGCCGA GGTAGAAGAA  
8881 CACCGCACCG TCCGTGTCCT GGAGATGGTG GAAGATTGGT TGCACAGAGG ACCGAAGGAA  
8941 TTCTGCATCA AAGTGCTATG CCCTTACATG CCCAAAGTGA TTGAGAAGAT GGAAACACTC  
9001 CAAAGGCGAT ATGGAGGTGG CCTTATAAGA AACCCCTTT CACGCAACTC TACCCATGAG  
9061 ATGTACTGGG TGAGCCACGC TTCAGGCAAT ATCGTCCACT CCGTCAACAT GACAAGCCAG  
9121 GTGCTTCTGG GGAGGATGGA AAAGAAAACA TGGAAGGGAC CCCAGTTTGA GGAAGATGTC  
9181 AACTTGGGAA GTGGAACGCG GGCAGTAGGG AAGCCTCTCC TCAATTCTGA TACTAGCAAG  
9241 ATCAAGAACC GAATTGAGAG GCTGAAGAAA GAATACAGCT CCACATGGCA CCAGGATGCG  
9301 AACCACCCCT ACAGGACCTG GAACTACCAC GGAAGCTATG AAGTGAAACC AACC GGCTCA  
9361 GCCAGCTCCC TTGTGAATGG GGTAGTCAGA TTACTCTCAA AACCATGGGA CACTATCACC  
9421 AATGTGACCA CGATGGCCAT GACAGACACC ACTCCTTTTCG GTCAACAACG AGTGTTC AAG  
9481 GAAAAGGTGG ACACAAAGGC TCCAGAGCCT CCAGAAGGAG TCAAATACGT CCTCAATGAG  
9541 ACCACGAACT GGCTGTGGGC TTTTTTAGCC CGCGATAAGA AACCCAGGAT GTGTTCCCGG  
9601 GAGGAATTTA TTGGAAAAGT CAACAGTAAT GCCGCCCTAG GAGCGATGTT TGAAGAACAG  
9661 AACCAATGGA AGAACGCCCC GGAAGCTGTA GAGGATCCAA AGTTTTGGGA GATGGTGGAT  
9721 GAGGAGCGTG AAGCGCATCT CCGTGGAGAA TGCAACACCT GCATCTACAA CATGATGGGA  
9781 AAGAGAGAGA AGAAGCCTGG AGAGTTCGGC AAAGCTAAAG GCAGCAGAGC CATCTGGTTC  
9841 ATGTGGCTGG GGGCCCGCTT CCTGGAGTTT GAAGCTCTCG GATTCTCAA TGAAGACCAC  
9901 TGGCTGGGTA GGAAGAACTC AGGAGGAGGA GTTGAAGGCT TAGGACTGCA GAAGCTCGGG  
9961 TACATCTTGA AGGAAGTTGG AACAAAGCCT GGAGGAAAGG TTTACGCTGA TGATAACGCA  
10021 GGCTGGGACA CACGCATCAC CAAAGCTGAC CTCGAGAATG AAGCGAAGGT TCTTGAAC TG  
10081 CTGGATGGAG AACATCGACG TTTAGCGCGG TCCATCATCG AGCTCACATA CCGACACAAA  
10141 GTCGTGAAAG TGATGAGGCC AGCGGCCGAC GGGAAAAC TGATGGACGT CATCTCTAGG  
10201 GAGGATCAGA GAGGAAGCGG TCAGGTAGTG ACTTACGCC TGAACACCTT CACCAATCTA  
10261 GCAGTTCAGC TGGTCAGAAT GATGGAGGGG GAGGGGGTCA TTGGACCCGA TGATGTTGAA  
10321 AACTTGGGAA AAGGAAAAGG CCCTAAGGTC AGAACCTGGC TGTTTGAGAA TGGCGAGGAG  
10381 CGTCTCAGTC GCATGGCCGT CAGCGGTGAT GACTGCGTGG TGAAACCTTT GGACGACCGC  
10441 TTCGCCACAT CACTACACTT CCTAAATGCT ATGTCAAAGG TCCGCAAAGA CATCCAGGAA  
10501 TGGAAACCCT CGACGGGGTG GTATGACTGG CAGCAGGTTT CATTCTGTTC AAACCATTTT  
10561 ACGGAACTGA TCATGAAGGA CGGCAGGACG CTGGTGGTCC CGTGTCTGTG ACAAGACGAG  
10621 TTGATTGGAC GTGCCAGGAT CTCTCCAGGG GCTGGATGGA ATGTGCGCGA CACCGCCTGC  
10681 CTGGCGAAGT CATA CGCGCA GATGTGGCTG CTGCTTTATT TCCACCGTAG AGACCTGAGA  
10741 TTGATGGCCA ATGCCATCTG TTCCGCTGTG CCTGCCAACT GGGTTCCAC AGGGCGTACC  
10801 ACTTGGTTCGA TCCACGCAA AGGAGAATGG ATGACGACGG AAGACATGCT CGCAGTCTGG  
10861 AACAGAGTGT GGATTGAGGA GAATGAGTGG ATGGAAGACA AAACACCAGT TGAGAGGTGG  
10921 AGTGATGTTT CATACTCTGG AAAGAGAGAG GACATTTGGT GTGGCAGTTT GATCGGCACA



```
10981 CGAACCCGCG CCACTTGGGC TGAAAATATC CATGTGGCAA TCAATCAGGT CCGTTCAGTG
11041 ATTGGAGAAG AGAAGTATGT GGATTACATG AGCTCCTTGA GGAGGTATGA AGACACCATT
11101 GTAGTGGAGG AACTGTTTTT GTAAAAGATA GTATTATAGT TAGTTTAGGC GGCCGCGCCC
11161 CTCTCCCTCC CCCCCCCTA ACGTACTTGG CCGAAGCCGC TTGGAATAAG GCCGGTGTGC
11221 GTTTGTCTAT ATGTTATTTT CCACCATATT GCCGTCTTTT GGCAATGTGA GGGCCCGGAA
11281 ACCTGGCCCT GTCTTCTTGA CGAGCATTCC TAGGGGTCTT TCCCCTCTCG CCAAAGGAAT
11341 GCAAGGCTGT TTGAATGTCTG TGAAGGAAGC AGTTCCTCTG GAAGCTTCTT GAAGACAAAC
11401 AACGTCTGTA GCGACCCTTT GCAGGCAGCG GAACCCCCCA CCTGGCGACA GGTGCCTCTG
11461 CGGCCAAAAG CCACGTGTAT AAGATACACC TGCAAAGGCG GCACAACCCC AGTGCCACGT
11521 TGTGAGTTGG ATAGTTGTGG AAAGAGTCAA ATGGCTCTCC TCAAGCGTAT TCAACAAGGG
11581 GCTGAAGGAT GCCCAGAAGG TACCCCATTTG TATGGGATCT GATCTGGGGC CTCGGTGCAC
11641 ATGCTTTACA TGTGTTTAGT CGAGGTTAAA AAAACGTCTA GGCCCCCGA ACCACGGGGA
11701 CGTGGTTTTTC CTTTGAAAAA CACGATGATA ATATGGCCAC AACCATGGTG AGCAAGGGCG
11761 AGGAGCTGTT CACCGGGGTG GTGCCCATCC TGGTTCGAGT GGACGGCGAC GTAAACGGCC
11821 ACAAGTTCAG CGTGTCCGGC GAGGGCGAGG GCGATGCCAC CTACGGCAAG CTGACCTGA
11881 AGTTCATCTG CACCACCGGC AAGCTGCCCG TGCCCTGGCC CACCCTCGTG ACCACCTGA
11941 CCTACGGCGT GCAGTGCTTC AGCCGCTACC CCGACCACAT GAAGCAGCAC GACTTCTTCA
12001 AGTCCGCCAT GCCCGAAGGC TACGTCCAGG AGCGCACCAT CTTCTTCAAG GACGACGGCA
12061 ACTACAAGAC CCGCGCCGAG GTGAAGTTCG AGGGCGACAC CCTGGTGAAC CGCATCGAGC
12121 TGAAGGGCAT CGACTTCAAG GAGGACGGCA ACATCCTGGG GCACAAGCTG GAGTACAAC
12181 ACAACAGCCA CAACGTCTAT ATCATGGCCG ACAAGCAGAA GAACGGCATC AAGGTGAACT
12241 TCAAGATCCG CCACAACATC GAGGACGGCA GCGTGCAGCT CGCCGACCAC TACCAGCAGA
12301 ACACCCCAT CGGCGACGGC CCCGTGCTGC TGCCCGACAA CCACTACCTG AGCACCCAGT
12361 CCGCCCTGAG CAAAGACCC AACGAGAAGC GCGATCACAT GGTCTGCTG GAGTTCGTGA
12421 CCGCCGCCGG GATCACTCTC GGCATGGACG AGCTGTACAA GTAAGCGGCC GCTGTAAATA
12481 GGATTTATTG AGAATGGAAG TCAGGCCAGA TTAATGCTGC CACCGGAAGT TGAGTAGACG
12541 GTGCTGCCTG CGGCTCAACC CCAGGAGGAC TGGGTGACCA AAGCTGCGAG GTGATCCACG
12601 TAAGCCCTCA GAACCGTCTC GGAAGGAGGA CCCACGTGC TTTAGCCTCA AAGCCAGTG
12661 TCAGACCACA CTTTAATGTG CCACTCTGCG GAGAGTGCAG TCTGCGATAG TGCCCCAGGT
12721 GGACTGGGTT AACAAAGGCA AAACATCGCC CCACGCGGCC ATAACCTGG CTATGGTGT
12781 AACCAGGGAG AAGGGACTAG AGGTTAGAGG AGACCCCGCG TAAAAAAGTG CACGGCCCAA
12841 CTTGGCTGAA GCTGTAAGCC AAGGGAAGGA CTAGAGGTTA GAGGAGACCC CGTGCCAAAA
12901 ACACAAAAG AACAGCATA TTGACACCTG GGATAGACTA GGGGATCTTC TGCTCTGCAC
12961 AACCAGCCAC ACGGCACAGT GCGCCGACAT AGGTGGCTGG TGGTGTCTAGA ACACAGGATC
13021 TGGCCGGCAT GGTCCCAGCC TCCTCGCTGG CGCCGGCTGG GCAACATTC GAGGGGACCG
13081 TCCCCTCGGT AATGGCGAAT GGGACTCGCG ACAGACATGA TAAGATACAT TGA
//
```

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

El inserto contiene un único gen susceptible de transcripción en células en cultivo bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) situado corriente arriba del primer cistrón que contiene el genoma completo del WNV (cepa WN 956 D117 3B) El segundo cistrón corriente abajo del final del marco abierto de lectura del virus codifica la proteína GFP bajo control traduccional del IRES del virus de la encefalomiocarditis y una ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) que permite la producción de la región 3' no traducida (3'UTR) del virus y liberarla así de una señal mínima de poliadenilación del virus SV40. El plásmido resultante es el pWNII-GFP descrito en detalle en Pierson et al. 2005 (PMID: 15749120). Los elementos reguladores de CMV, HDV y SV40 no alteran la patogenicidad del virus recombinante, sino que permiten la expresión independiente de GFP.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:



Transcripción inversa y PCR de fragmentos. Clonaje molecular mediante enzima de restricción en vectores plasmídicos intermedios. Descrito en Pierson et al. 2005 (PMID: 15749120).

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

Poliproteína del WNV que se traduce como único marco abierto de lectura y se procesa post-traduccionalmente en la célula transfectada para dar lugar a las proteínas virales: core, M, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. En el segundo cistrón se encuentra la gen marcador GFP

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

-Regiones 5' y 3' no traducidas del genoma del WNV esenciales para la replicación y producción de virus infecciosos.

-Promotor del CMV, empleado para la transcripción de un pseudogenoma en forma de ARN mensajero discistrónico.

-Elemento de poliadenilación del virus SV40, necesario para la estabilidad del transcrito primario.

-Sitio de entrada directa del ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis, permite la traducción del segundo cistrón (GFP).

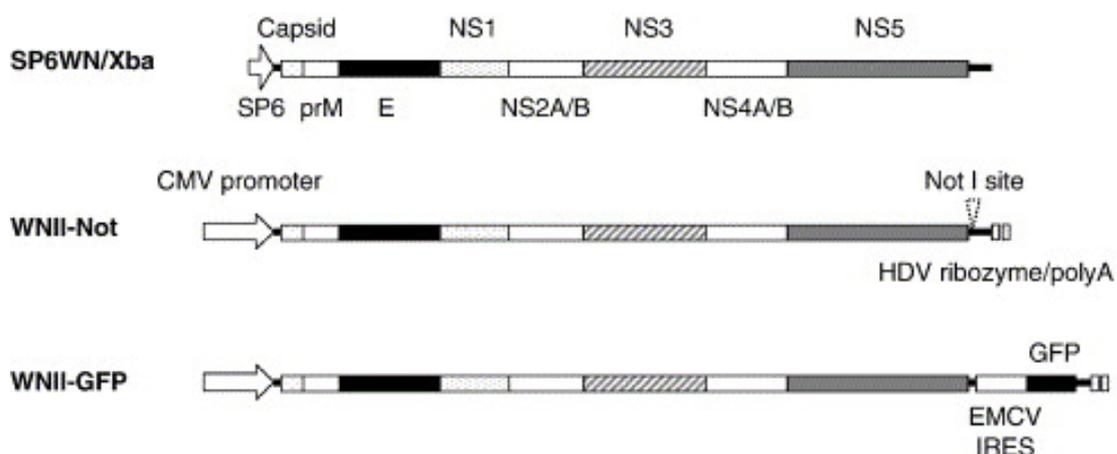
-Ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV), permite el autoprocésamiento del transcrito primario para la generación de un genoma viral completo y dicistrónico.

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? **SI**

En caso afirmativo:

i) Número de copias: **Bajo número de copias**

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido? **Si.**

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?: **NO**

En caso afirmativo:

i) número de copias:

ii) localización cromosómica:

iii) secuencias colindantes

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

c) Si se trata de un virus:

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*):

iv) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

vi) 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:

La principal modificación genética del organismo receptor es la introducción de elementos exógenos en el genoma de un clon infeccioso que permiten la expresión de la proteína GFP en células infectadas. Fenotípicamente, la capacidad replicativa del virus y su efecto citopático



son menores que la cepa parental. La infección por este virus conlleva la expresión de GFP, por lo que se puede revelar mediante microscopía de fluorescencia en células infectadas.

- 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 hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar: **NO**
  - 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:
  - f) Marcadores específicos del OMG: **El virus recombinante porta el gen reportero GFP.**
- 3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):

La estabilidad genética del plásmido que contiene la secuencia del genoma viral es alta. De hecho se emplea esta estrategia para limitar la deriva genética típica de los virus RNA. Los virus de genoma de RNA son inherentemente inestables genéticamente. El rescate de virus a partir de cDNA clonado permite controlar mejor las características genéticas del virus que se manipula, lo cual reduce considerablemente los riesgos biológicos asociados.

- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos: **No se ha descrito**
- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:

- f) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Mediante transcripción inversa y PCR de tejidos o cultivos infectados. Adicionalmente técnicas de inmunomarcado con anticuerpos específicos frente a proteínas virales para Western-Blot, inmunomicroscopía y ELISA.

- g) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:

El WNV puede ser aislado mediante técnicas virológicas convencionales en cultivo celular. Para su identificación inequívoca se requieren técnicas de biología molecular.



## 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: 10 ml
- b) Número de plantas: 0
- c) Número de animales: 0

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

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

Se prevé un periodo mínimo de 5 años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.

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

Producción segura de virus infecciosos recombinantes de la fiebre del Nilo occidental (WNV) a partir de cDNAs clonados con objeto de estudiar aspectos básicos de su biología, incluyendo los factores celulares y virales que regulan la infección por WNV en cultivo celular. Dichos genomas están basados en cepas aisladas de pacientes que han sido alteradas genéticamente para adaptarlos a cultivo celular.

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. En el caso de centros españoles, indicar el número de notificación si se conoce:

No se ha enviado el OMG, sino su precursor en forma de ADN plasmídico. El plásmido pWNVII-GFP descrito en Pierson et al. 2005 (PMID: 15749120) ha sido cedido por Robert Doms (U. Pennsylvania, USA) y enviado por correo ordinario como DNA purificado.

6) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo



en virtud de la legislación aplicable<sup>1</sup> (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*): **NO APLICA**

- 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*):

### **Preparación de stocks virales e infección**

La cepa viral WNV-GFP se producirá por transfección de  $2 \times 10^6$  células HEK-293T con 4  $\mu$ g del plásmido pWNII-GFP [67] utilizando el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en optiMEM. Seis horas después de la transfección, el medio se renovará con medio de cultivo HEK-293T. Los sobrenadantes que contenían virus recogidos 48 h después de la transfección se clarificarán a través de un filtro de 0,45  $\mu$ m (Corning).

El rescate del virus se realizará en el P3 del CNB donde se utilizarán equipos de protección individual. Como es preceptivo, todos los residuos biosanitarios generados se inactivarán en un primer paso en el interior de la cabina de flujo laminar. Posteriormente volverán a ser inactivados mediante autoclave (residuos sólidos) o en la planta de inactivación de efluentes líquidos del laboratorio (residuos líquidos). El investigador responsable del proyecto y encargado de su ejecución ha recibido cursos de formación en bioseguridad y de nivel 3 de contención biológica en el CNB, y ha trabajado con virus de nivel de contención 3 (hepatitis C recombinante) a lo largo de más de 13 años. Se seguirán todos los procesos preceptivos, tales como no sacar los brazos de la cabina de trabajo sin desinfectarlos, desinfectar cualquier objeto que esté en el interior de la cabina y esperar diez minutos antes de sacarlo. Todos los investigadores que trabajen regularmente en el P3 con el WNV-GFP, guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier animalario de experimentación animal. Ninguna persona embarazada estará expuesta al virus.

### **Infecciones experimentales en líneas celulares humanas**

Para estudios de propagación del virus en células humanas, se emplearán Huh-7 (hepatoma humano) y A549 (carcinoma pulmón humano). Dichas infecciones se prevén en dos modalidades: alta multiplicidad (MOI 5) y baja multiplicidad (MOI 0.01). Dichas infecciones se realizarán en modelos miniaturizados de cultivos celulares desde placas de 96 pocillos a placas de 6 pocillos (35mm), empleando volúmenes máximos de cultivo de 2ml por pocillo.

---

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

- **(ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas)** del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligosas 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.
- **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/>



Para determinar la eficiencia de infección en distintas condiciones experimentales, se tomarán muestras de sobrenadantes, así como de las células infectadas. Ninguna de estas muestras abandonará la instalación sin ser previamente tratada con 4% formaldehído en PBS, detergentes (0.1% SDS; 0.5% Triton X100; 0.5% NP40) o agentes caotrópicos como el isotiocianato de guanidina (4M). Las muestras serán transportadas tras su inactivación en la exclusiva al laboratorio para su análisis.

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

## **X. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS**

1) Encargado de la gestión de residuos:

- |                                     |    |                                     |    |                          |
|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|--------------------------|
| a) gestión interna:                 | SÍ | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| b) gestión por una empresa externa: | SÍ | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |

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

2) Inactivación de residuos: método, 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.

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

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 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:

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



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

**Nº de Notificación:**

**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](mailto:direccion@cnb.csic.es)
  
- 3) Responsable científico de la actividad  
Nombre y apellidos: [Pablo Gastaminza Landart](#)  
NIF: [44145453N](#)  
Cargo: [Investigador Distinguido](#)  
Tel: [91 585 4678](#)  
Fax: [91 585 4506](#)  
Correo electrónico: [pgastaminza@cnb.csic.es](mailto:pgastaminza@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](mailto:fusera@cnb.csic.es)
  
- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto  
[Fernando Usera Mena](#)

**II.**



## **II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.**

*(En el caso de que se notifiquen varias actividades de tipo 1, deberá rellenarse este apartado y adjuntar un cuadro resumen en que se recojan todas las actividades, según el modelo que figura en el anexo).*

### **1) Objetivo de la actividad:**

Producción segura de virus infecciosos recombinantes de la fiebre del Nilo Oriental (WNV) a partir de su genoma (cDNA clonado), con objeto de estudiar aspectos básicos de su biología, incluyendo los factores celulares y virales que regulan la infección por WNV en cultivo celular. Dicho genoma está basado en una cepa (WN 956 D117 3B; linaje II) aislada de un paciente.

No se plantea modificar genéticamente ningún organismo, sino producir un virus recombinante con un gen marcador correspondiente a la proteína verde fluorescente (GFP) para su uso confinado en tareas de investigación biomédica en cultivo celular. En concreto, se empleará un plásmido bacteriano (pWNVII-GFP), previamente generado por otro laboratorio, que contiene la secuencia completa del genoma viral en un vector (pBR322) que permite su transcripción in vitro para la producción de genomas virales completos en forma de RNA desnudo. Dicho material genético permitirá simular una infección viral mediante su introducción en células susceptibles que producirán el virus infeccioso recombinante. Por lo tanto, en esta propuesta se considerará el WNV como organismo receptor que ha sido insertado en un plásmido bacteriano.

La construcción plasmídica descrita aquí (pWNVII-GFP) ha sido generada con anterioridad El plásmid, el proceso se describe en detalle en Pierson et al. 2005 (PMID: 15749120) y ha sido empleado para rescatar virus recombinantes en diversos laboratorios NCB3 en el mundo.

### **Duración prevista de la actividad:**

Se prevé un periodo mínimo de 5 años desde la recepción de la autorización de la actividad 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).*

## **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).*

*(En el caso de actividades de tipo 1 se incluirá en este apartado un listado de los principales organismos y material genético utilizados (organismos receptores, organismos donantes, insertos, vectores y organismos modificados genéticamente resultantes), así como la evaluación del riesgo para la salud humana y el medio ambiente de los mismos).*



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.**

El WNV (serotipo 2; WN 956 D117 3B) es un flavivirus transmitido por mosquitos que infectan humanos.

**b) Organismo donante.**

*Renilla reniformis*

**c) Inserto.**

Proteína verde fluorescente (GFP)

**d) Vector.**

El vector empleado (pBR322) contienen las secuencias mínimas para la propagación de los plásmidos en E.coli y conferir resistencia a ampicilina a las bacterias portadoras del plásmido.

**e) Organismo modificado genéticamente resultante.**

El plásmido resultante es el pWNII-GFP descrito en detalle en Pierson et al. 2005 (PMID: 15749120). El vector contiene un único gen susceptible de transcripción en células en cultivo bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) situado corriente arriba del primer cistrón que contiene el genoma completo del WNV (cepa WN 956 D117 3B) El segundo cistrón corriente abajo del final del marco abierto de lectura del virus codifica la proteína GFP bajo control traduccional del IRES del virus de la encefalomiocarditis y una ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV) que permite la producción de la región 3' no traducida (3'UTR) del virus y liberarla así de una señal mínima de poliadenilación del virus SV40

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

El virus del oeste del Nilo se transmite más comúnmente a las personas por la picadura de un mosquito infectado. Los mosquitos se infectan cuando se alimentan de aves infectadas. Los mosquitos infectados luego propagan el virus del Nilo Occidental a las personas y otros animales al morderlos. En un número muy pequeño de casos, el virus del Nilo Occidental se ha diseminado a través de:

Exposición en un entorno de laboratorio

Transfusión de sangre y donación de órganos

Madre a bebé, durante el embarazo, el parto o la lactancia



**Sin síntomas en la mayoría de las personas.** La mayoría de las personas (8 de cada 10) infectadas con el virus del Nilo Occidental no desarrollan ningún síntoma.

**Enfermedad febril (fiebre) en algunas personas.** Aproximadamente 1 de cada 5 personas infectadas desarrollan fiebre con otros síntomas como dolor de cabeza, dolores en el cuerpo, articulaciones, vómitos, diarrea o sarpullido. La mayoría de las personas con este tipo de enfermedad del virus del Nilo Occidental se recuperan por completo, pero la fatiga y la debilidad pueden durar semanas o meses.

**Síntomas graves en algunas personas.** Aproximadamente 1 de cada 150 personas que están infectadas desarrollan una enfermedad grave que afecta el sistema nervioso central, como la encefalitis (inflamación del cerebro) o la meningitis (inflamación de las membranas que rodean el cerebro y la médula espinal).

Los síntomas de una enfermedad grave incluyen fiebre alta, dolor de cabeza, rigidez en el cuello, estupor, desorientación, coma, temblores, convulsiones, debilidad muscular, pérdida de visión, entumecimiento y parálisis.

Una enfermedad grave puede ocurrir en personas de cualquier edad; Sin embargo, las personas mayores de 60 años corren un mayor riesgo. Las personas con ciertas afecciones médicas, como cáncer, diabetes, hipertensión, enfermedad renal y personas que han recibido trasplantes de órganos, también corren un mayor riesgo.

La recuperación de una enfermedad grave puede demorar varias semanas o meses. Algunos efectos en el sistema nervioso central pueden ser permanentes. Aproximadamente 1 de cada 10 personas que desarrollan una enfermedad grave que afecta el sistema nervioso central muere.

**f) Efectos para el medio ambiente.**

No aplica.

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

Tipo 2

Tipo 3

Tipo 4



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 del virus 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.

La concentración de virus obtenida mediante las técnicas empleadas se encontrarán por debajo de  $10^6$  PFU/ml con volúmenes máximos que no superarán los 10ml.

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 rescate de virus recombinantes se realizará en células HEK293T empleando para su cultivo frascos con tapón de filtro o, en caso de emplear placas multipocillo, se emplearán contenedores secundarios con filtro, todo ello introducido en cajas resistentes a prueba de caída. Los experimentos de transfección y de infección en células Huh-7 se realizarán en el laboratorio de contención biológica de nivel 3, por lo que el personal y el entorno expuestos se reducen al máximo.

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 Bioseguridad 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 bioseguridad. 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.

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.

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