



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

Nº de Notificación:

**I. INFORMACIÓN GENERAL**

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergente, Universidad de Zaragoza

Dirección postal: Pedro Cerbuna, 12. Campus San Francisco, 50009 ZARAGOZA

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Rosa Bolea Bailo

NIF: 72964847S

Cargo: Vicerrectora de Política científica en funciones

Tel: 976 761759

Fax:

Correo electrónico: [vrinves@unizar.es](mailto:vrinves@unizar.es)

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Juan Jose Badiola Diez, Carlos Martín Montañés, y Julián Pardo Jimeno

NIF: 30040626G, 17866278Q y 25469556 T

Cargo: Profesor e investigadores de la UNIZAR

Tel: 976 76 17 59

Correo electrónico: [badiola@unizar.es](mailto:badiola@unizar.es), [carlos@unizar.es](mailto:carlos@unizar.es), [pardojim@unizar.es](mailto:pardojim@unizar.es)

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

Nombre y apellidos: Rosa Bolea Bailo

NIF: 72964847S

Cargo: Vicerrectora Política científica

Tel: 976 761759

Fax:

Correo electrónico: [vrinves@unizar.es](mailto:vrinves@unizar.es)

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

Los tres



- 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

Si la respuesta a la pregunta anterior es **SI**, debe justificarlo especificando<sup>1</sup>:

- 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:

b) Número de referencia del expediente:

## II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

Finalidad de la actividad:

Expansión del virus rSARS-CoV-MA15 en células VERO.E6 in vitro.

El estudio se realizará en el laboratorio de Seguridad Biológica del Centro de Encefalopatías de la Universidad de Zaragoza en colaboración con el equipo del Profesor Luis Enjuanes Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del CSIC, que adaptó la cepa de SARS-CoV a infección en ratón y con enorme experiencia en su uso en modelo vacuna.

Los objetivos concretos de la presente propuesta son:

---

<sup>1</sup>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.



- Expandir el virus rSARS-CoV-MA15 con el fin de llevar a cabo los experimentos in vivo notificados y autorizados anteriormente por el Consejo Interministerial de OMGs con el número A/ES/20/99.

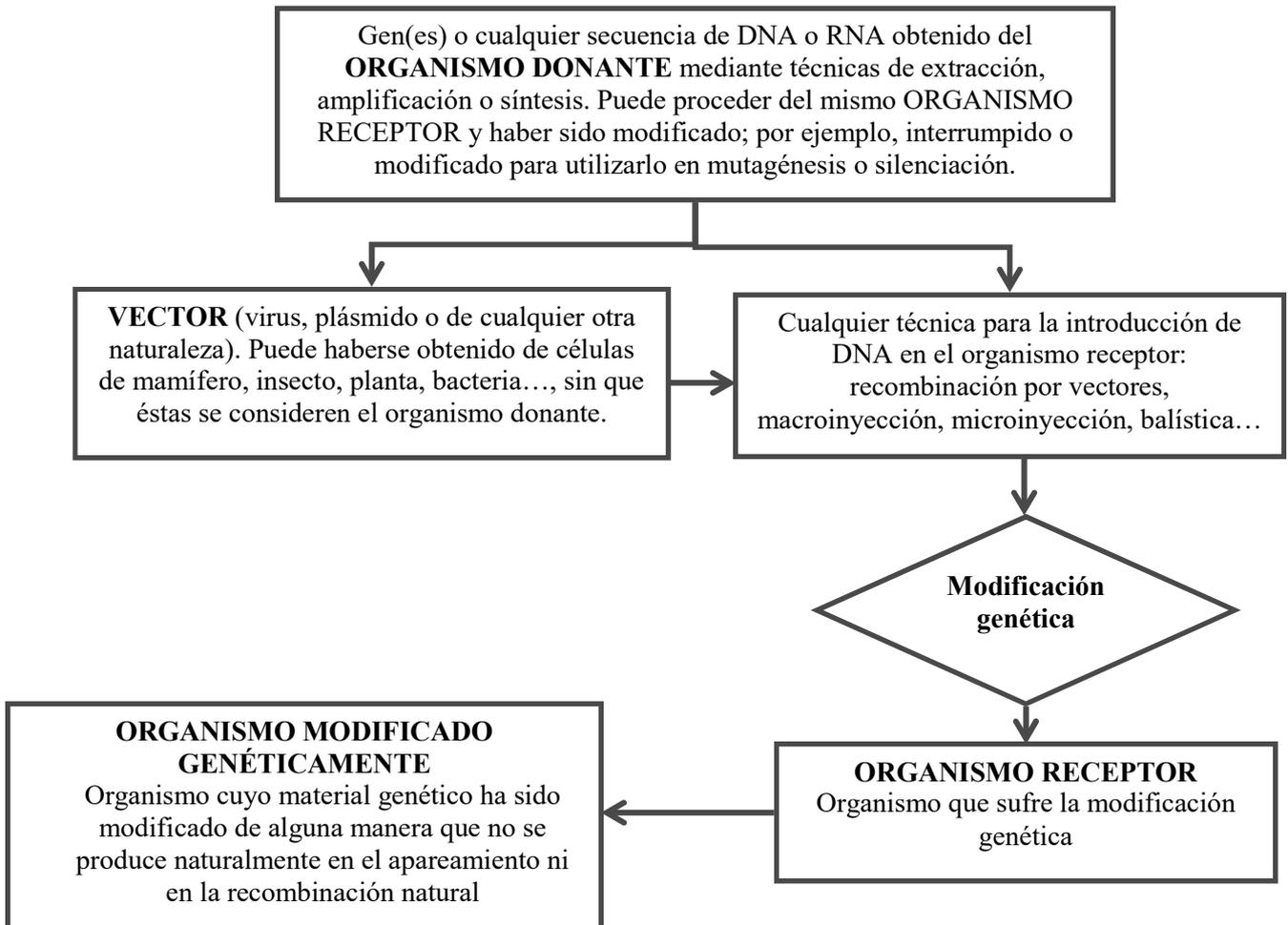
1) Clasificación de la actividad:

*(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: Virus recombinante SARS-CoV (rSARS-CoV)

Taxonomía: perteneciente a la Familia *Coronaviridae*, género *Betacoronavirus*, subgénero *Sarbecovirus*

Nombre común: recombinante del coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo y Grave cepa (SARS-CoV).

En esta solicitud no se va a generar el virus recombinante, sino que se notifica el uso de un virus recombinante modificado genéticamente previamente generado en el laboratorio del Dr- Luis Enjuanes del CNB de Madrid y que será proporcionado por este. En él se partió de la cepa rSARS-CoV sobre la que se introdujeron las mutaciones necesarias para generar una cepa adaptada a ratón SARS-CoV-rMA15 para que fuera capaz de provocar infección en los animales. La cepa humana SARS-CoV no infecta y no es patógena en ratones.

No obstante, por motivos de claridad se indica toda la información correspondiente del organismo receptor original sobre el que se llevo a cabo la modificación genética, así como la modificación llevada a cabo.

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

a) Técnicas de aislamiento: El virus rSARS-CoV-MA15 se obtendrá a partir de un clon (cDNA) infectivo. Este cDNA codificaba el genoma del virus SARS-CoV cepa Urbani (referencia GenBank: AY278741), con dos mutaciones silenciosas en los nt 10338 (C por T) y 11163 (T por A) como marcadores genéticos. Para su obtención se clonaron secuencialmente 5 fragmentos de DNA obtenidos por RT-PCR a partir de RNA total de células infectadas con SARS-CoV procedentes del CDC Atlanta (USA) utilizando oligonucleótidos específicos. El cDNA se mantuvo en un cromosoma artificial de bacterias (BAC), que se utilizó como vector y se amplificó en una cepa de bacterias *Escherichia coli* no patógena. La última etapa del clonaje y el rescate del virus se realizó en el laboratorio NCB3 del CNB-CSIC. Para aislar el virus rSARS-CoV se transfectaron células Vero E6 con el cDNA generado. Este procedimiento se realizó en frascos de cultivos cerrados. A las 48 -72 horas posttransfección (hpt) se recogió el medio de cultivo que contendrá el rSARS-CoV. Las secuencias del BAC (pBeloBac11.pdf) y del inserto que codifica el rSARS-CoV (SARSCoV.pdf), así como las secuencias de los 5 fragmentos (F1.pdf, F2.pdf, F3.pdf, F4.pdf y F5.pdf) se adjuntaron en la solicitud de la que ya se tiene autorización con A/ES/06/16 y A/ES/06/12.

#### b) : Técnicas de identificación

Para la identificación del rSARS-CoV se amplifica su genoma mediante RT-PCR y se procede a secuenciar completamente el genoma viral. De este modo, se comprobó que su secuencia coincide con la codificada por el cDNA infectivo, incluyendo los dos marcadores genéticos que distinguen este virus recombinante de cualquier SARS-CoV aislado de pacientes.

#### c) Marcadores genéticos:



Se han introducidos dos marcadores genéticos que consisten en dos mutaciones silenciosas en los nt 10338 (C por T) y 11163 (T por A).

d) Marcadores fenotípicos:

No aplicables

e) Estabilidad genética:

La estabilidad genética del virus recombinante rSARS-CoV es elevada. No se han descrito variaciones de secuencia debido al crecimiento de este tipo de virus en cultivos celulares. Además, se darán pocos pasos una vez rescatado el rSARS-CoV a partir del cDNA infeccioso.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Dos mutaciones silenciosas en los nt 10338 y 11163 como marcadores genéticos. No hay ninguna modificación genética no deseada que se encuentre con anterioridad

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI  NO

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

El virus rSARS-CoV será patógeno para humanos. Con la información disponible, se considera que el origen del virus silvestre (SARS-CoV) es el murciélago y que las civetas actuaron como animal hospedador intermedio. Los coronavirus SARS-CoV y MERS-CoV, aunque son virus patógenos para humanos, no causan enfermedad en los animales hospedadores intermedios

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

El organismo receptor rSARS-CoV, patógeno para humanos, se clasifica como nivel 3

a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

Se espera que la patogenicidad del rSARS-CoV sea idéntica a la del virus SARS-CoV silvestre, causando infección respiratoria severa que puede llegar a ser mortal en promedio 8 de 28 en el 10% de los individuos infectados, aunque la mortalidad es muy dependiente de la edad. Los síntomas clínicos de la infección serían fiebre, tos y dificultad respiratoria con signos de neumonía.

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

No aplicable

SI  NO



Porqué:

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

Las células Vero E6, en las que se propaga el rSARS-CoV-2019, están libres de agente biológicos contaminantes

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

El trabajo con virus similares (SARS-CoV, MERS-CoV) que resultan letales para humanos, se realiza en todo el mundo (EEUU, Europa, China) en laboratorios de contención biológica NCB3, Se llevará a cabo en un centro que ha sido acreditado previamente para el uso de OMGs y tiene los protocolos necesarios para el trabajo con este virus. Nuestro grupo ha estado trabajando durante más de 15 años con virus y otros patógenos incluyendo respiratorios de tipo 3 como LCMV, Ectromelia, *M. tuberculosis* o *Brucella* spp. Durante los últimos 7 meses hemos trabajado también con el SARS-CoV-2, coronavirus causante del COVID19. De hecho, nuestro equipo ha aislado la primera cepa en la Comunidad de Aragón con la que lleva trabajando desde abril y con la que se ha llevado el primer estudio que se encuentra en fase de revisión, trabajo coordinado por Julián Pardo en colaboración con el equipo de Carlos Martín (*Santiago et al. Determination of the concentration of IgG against the Spike Receptor-Binding Domain that predicts the viral neutralizing activity of convalescent plasma and serum against SARS-CoV-2*).

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

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

Para sobrevivir el virus rSARS-CoV necesita de la maquinaria de la célula infectada. Por tanto, su capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivos será muy limitada. Se ha determinado que el virus rSARS-CoV podría sobrevivir 24 – 48 h fuera de la célula

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:

La exposición a temperaturas iguales o mayores a 37°C, a luz ultravioleta, o a agentes químicos reduce drásticamente la capacidad de supervivencia del rSARS-CoV fuera de las condiciones de cultivo

d) Posibles nichos ecológicos:

El virus rSARS-CoV no se encuentra en la naturaleza, dado que se obtendrá en el laboratorio a partir del cDNA infeccioso.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplicable

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

El virus rSARS-CoV no se encuentra en el medio ambiente.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

El virus rSARS-CoV no interactúa con otros organismos ya que está confinado en el laboratorio NCB3 y es poco probable que salga de él ya que es incapaz de propagarse fuera de un cultivo celular

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

El virus rSARS-CoV con el que se va a trabajar no se encuentra en la naturaleza ya que ha sido generado en el laboratorio.

12) Hábitat natural del organismo:

El virus rSARS-CoV con el que se va a trabajar no se encuentra en la naturaleza ya que ha sido generado en el laboratorio.

El virus silvestre SARS-CoV circuló en la población humana durante el brote iniciado en China en noviembre de 2002, que la OMS declaró terminado en agosto de 2003. En esta epidemia, SARS-CoV infectó 8422 personas y causó la muerte de unas 800. Desde entonces, no se ha detectado la circulación del virus SARS-CoV en la población humana.

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

1) Nombre científico:



Taxonomía:

Nombre común:

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in Vitro*

4) Función del gen/genes en el organismo donante:

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?

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

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

## 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:

Modificación de genes de rSARS-CoV (sustitución de bases) para generar una cepa recombinante (rMA15) adaptada a ratón y que permita estudiar la interacción con el hospedador y virulencia de dicho virus en un modelo in vivo, así como analizar la eficacia de diferentes tratamientos incluyendo vacunas. Se llevaron a cabo estrategias similares a las que se han utilizado previamente en el equipo de Luis Enjuanes (Nieto-Torres J.L. et al, 2014, PLoS Pathog. 10: e1004077; Jimenez-Guardeño J.M. et al, 2014, PLoS Pathog. 10: e1004320). En concreto para la generación del mutante MA15 adaptado a ratón se introdujeron las mutaciones dentro de Nsp5 (H133Y, K268N), Nsp9 (T67A), Nsp13 (A4V), S protein (Y436H), y M protein (E11K), generándose así la cepa rMA15 como se describe en Fett et al. J Virol . Estas mutaciones se basaron en las descritas para la cepa no recombinante MA15 que se generó mediante infecciones consecutivas en ratones Balb/c (Roberts A, et al 2007. e) PLoS Pathog). Al contrario que la cepa original SARS-CoV aislada de humanos la cual no es virulenta en ratones, la cepa rMA15 mostraba alta virulencia en ratones envejecidos.

Se obtuvieron distintos clones de BACs que contengan uno o varios genes virales modificados, a partir de los cuales se rescataron los virus modificados. **El objetivo final es generar virus adaptados a ratón que puedan servir para evaluar la eficacia de la vacuna BCG y MTBVAC para prevenir la enfermedad causada por SARS-CoV2 y el mecanismo inmunológico implicado en la patogénesis del SARS y en la protección ofrecida por dicha vacuna tal y como se describió en la actividad notificada y autorizada anteriormente por el Consejo Interministerial de OMGs con el número A/ES/20/99.**

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

Se utilizó un sistema de genética inversa usando un cromosoma artificial de bacterias (BAC) descrito en detalle anteriormente (Almazán et al J Virol 2006). Tal y como se ha indicado anteriormente esta modificación se llevó cabo en el laboratorio del Dr. Luis Enjuanes, el cual nos cederá el virus rMA15.

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

SÍ  NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

Cromosoma artificial bacteriano (pBAC-SARS-CoV) que contiene el cDNA correspondiente al RNA del virus.

b) Si se trata de un virus:

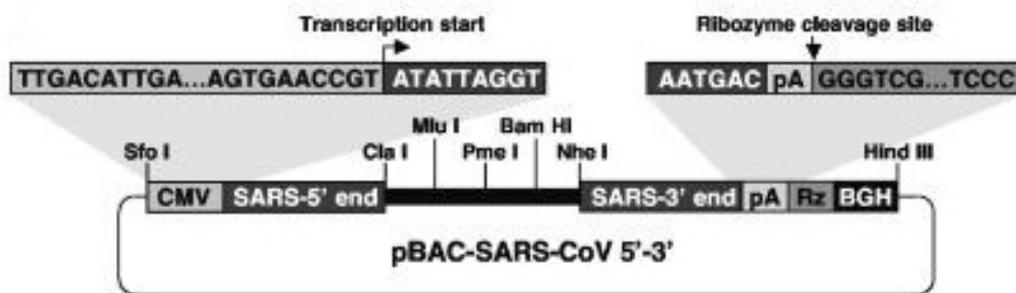
Es defectivo en replicación SÍ  NO

- 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*):

El mapa y todos detalles del inserto se describen en detalle en las referencias originales y en las solicitudes previas A/ES/06/16 y A/ES/06/12. Almazán, Dediego, Galán, Escors, Alvarez, Ortego, Sola, Zuñiga, Alonso, Moreno, Nogales, Capiscol and Enjuanes. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol.* 2006; Fett, DeDiego, Regla-Nava, Enjuanes and Perlman. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. *J Virol.* 2013 Jun;87(12):6551-9.

Está basado en el vector pBELOBAC11 (<https://www.addgene.org/vector-database/6242/>).

El esquema se muestra a continuación,



- d) Gama de hospedadores del vector:

Bacterias

- e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

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

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

- 5) Información del inserto:

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

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

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

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



- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:
- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?
- g) ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese.
- h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.



## VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? No aplicable

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?: No aplicable

En caso afirmativo:

i) número de copias: No aplicable

ii) localización cromosómica: No aplicable

iii) secuencias colindantes No aplicable

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.

Artículo : Fett , DeDiego, Regla-Nava, Enjuanes and Perlman. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. J Virol. 2013 Jun;87(12):6551-9.



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:

En cuanto a los virus recombinantes generados no se esperan cambios en la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones en cultivo

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

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

El receptor es un SARS-CoV humano no virulento en ratones. El OMG derivado se ha adaptado para que provoque enfermedad en ratones.

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

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

- f) Marcadores específicos del OMG:

Virus rMA15: Mutaciones dentro de las secuencias que codifican las proteínas Nsp5 (H133Y, K268N), Nsp9 (T67A), Nsp13 (A4V), S protein (Y436H), y M protein (E11K).

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

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

Los virus resultantes no se prevé que se integren en el cromosoma de las células utilizadas para crecerlos, por lo que no se transferirá material genético a las mismas. Los virus resultantes estarán confinados en el laboratorio y animalario de nivel 3 de contención biológica (NCB3).

- 4) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:

- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Secuenciación y PCR.

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

El OMG no se va a liberar al medio ambiente.



## VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

- a) Enseñanza
- b) Investigación
- c) Desarrollo

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

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

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

Noviembre 2020 – Diciembre 2025

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

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

Expansión de la cepa SARS-CoV-rMA15 para

- analizar la eficacia de la vacunación con MTBVAC en comparación con BCG, en ratones wt Balb/c y C57Bl/6 frente a la infección con la cepa SARS-CoV-rMA15.

- analizar el papel de la respuesta inflamatoria y de las células T y NK en el curso de la infección con la cepa adaptada a ratón en ratones wt vacunados o no con MTBVAC y BCG.

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:

El virus utilizado procede del CNB, grupo del Dr Enjuanes quien lo cede/ colabora a los investigadores para los estudios indicados arriba. Dicho centro ha sido registrado previamente tal y como se indica en A/ES/06/16 y A/ES/06/12

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>2</sup> (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*)

El virus será enviado mediante una empresa de transporte de mercancías peligrosas, cumpliendo todas las medidas de seguridad según el reglamento de transporte de materias peligrosas por carretera. Los destinatarios cumplimentarán toda la documentación requerida, tal como corresponde a material infeccioso categoría A

- 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*):

Ensayos in vitro:

En todos los casos, los virus recombinantes se manejarán en frascos cerrados en todo momento,

En ningún momento se centrifugará el virus no inactivado ni se someterá a manipulaciones que puedan suponer un incremento del riesgo biológico.

## REFERENCIAS

1. Almazán F, Dediego ML, Galán C, Escors D, Alvarez E, Ortego J, Sola I, Zuñiga S, Alonso S, Moreno JL, Nogales A, Capiscol C, Enjuanes L. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol.* 2006 Nov;80(21):10900-6. PubMed PMID: 16928748.
2. DeDiego ML, Alvarez E, Almazán F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh WJ, Zaki SR, Subbarao K, Enjuanes L. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol.* 2007; 81(4):1701-13. PubMed PMID: 17108030
3. Enjuanes L, Dediego ML, Alvarez E, Deming D, Sheahan T, Baric R. Vaccines to prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced disease. *Virus Res.* 2008;133(1):45-62.. PubMed PMID: 17416434. 21 de 284.
4. Alvarez E, DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Jiménez-Guardeño JM, Marcos-Villar L, Enjuanes L. The envelope protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus

---

<sup>2</sup> 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.
- **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/>



interacts with the non-structural protein 3 and is ubiquitinated. *Virology*. 2010;402(2):281-91. doi: 10.1016/j.virol.2010.03.015. PubMed PMID: 20409569.

5. Netland J, DeDiego ML, Zhao J, Fett C, Álvarez E, Nieto-Torres JL, Enjuanes L, Perlman S. Immunization with an attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus deleted in E protein protects against lethal respiratory disease. *Virology*. 2010;399(1):120-128. doi: 10.1016/j.virol.2010.01.004. PubMed PMID: 20110095.

6. Roberts A, Deming D, Paddock CD, Cheng A, Yount B, Vogel L, Herman BD, Sheahan T, Heise M, Genrich GL, Zaki SR, Baric R, Subbarao K. 2007. A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS Pathogens*.

7. Fett , DeDiego, Regla-Nava, Enjuanes and Perlman. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. *J Virol*. 2013 Jun;87(12):6551-9

8. Almazán , Dediego, Galán, Escors, Alvarez, Ortego, Sola, Zuñiga, Alonso, Moreno, Nogales, Capiscol and Enjuanes Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol*. 2006

9. Zhao J; Falcon A; Zhou H; Netland J; Enjuanes L; Perez Brena P; Perlman S. 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 is required for optimal replication. *J Virol* 83(5):2368-73. PubMed: 19091867MGI: J:283997

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

El laboratorio cuenta con medidas de confinamiento de nivel 3, presión negativa, SAS, autoclave de doble puerta, zona de acceso para cambio de ropa, zona de duchas de descontaminación , sala sucia para lavado de material . Las indicaciones de uso, acceso y limpieza de las distintas zonas están recogidas en el Anexo a esta documentación.

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

#### 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El CIEETE, es un edificio independiente

Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Zaragoza está situado en el centro del valle del Ebro. Temperaturas calurosas en verano, llegando a alcanzarse hasta los 40° en días puntuales, y frío ligero en invierno, llegando a mínimas de -2 -3°C puntualmente. Viento a rachas con una frecuencia del 40% y una velocidad media de 30km/hora.



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

Nº notificación: A/ES/16/I-24 autorizada según CIOMG: 17.05.17 , como de nivel 3

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

- 1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio: Las normas básicas de bioseguridad son las recogidas en el Manual para trabajos en laboratorios con agentes de nivel 3.

El personal tiene experiencia en trabajos en el BSL3 y en técnicas de laboratorio en esta infraestructura.

- 2) Formación del personal adscrito: Personal con amplia experiencia en los últimos años en el trabajo con agentes patógenos de nivel 3, tanto en cultivos, aislamientos, y técnicas de biología molecular, inmunología y trabajo con animales.

Todos ellos están formados para trabajar en condiciones de contención, y seguridad, y a la llegada a esta instalación recibieron un curso para el uso, acceso y manejo de la instalación”

- 3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación: Todo el material que se utilice dentro será descontaminado con los productos adecuados (ver procedimiento de uso), y los desechos contaminados, se retiraran siguiendo la normativa de residuos peligrosos infecciosos de la instalación. La empresa autorizada por la Comunidad Autónoma, es la encargada para recoger los residuos peligrosos generados en la instalación.

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

- 5) Programas de inspección y control del confinamiento: Registro de presiones, temperaturas, acceso usuarios.

## **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:

La Universidad de Zaragoza, tiene contratada para la retirada de Residuos biológicos peligrosos, que recoge de acuerdo a una periodicidad establecida. Inactivación de residuos: método, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados:



El material utilizado será desechable, con lo que todo el material será eliminado. Los restos de cultivo, mediante inactivación con el desinfectante disponible en la CBS, de acuerdo al PNT de “Acceso y Uso laboratorio”, El aire de la zona es filtrado mediante filtros HEPA H14.

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

- 1) Condiciones en las que podría producirse un accidente: Rotura golpes en contenedores cultivos, rotura en centrifugación, Indicadas todas ellas en el plan de autoprotección del Edificio
- 2) Equipamiento de seguridad (especifíquese): EPIS de seguridad, Cabinas de bioseguridad, Centrífugas con rotores antierosoles, racks con filtros HEPA, y ventilación independiente
- 3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores: Usuarios con experiencia en el trabajo con virus en condiciones de contención biológica, tal como se indica anteriormente. Training de acceso, uso de la instalación previa a su comienzo.
- 4) Planes de emergencia: Existe un plan actualizado de emergencias del edificio. Salidas de emergencias y evacuación indicado en la cartelería de la que dispone el edificio. Todo este material está disponible para los investigadores involucrados, la Unidad de prevención de Riesgos laborales de la institución suministra este tipo de material previo a la firma de cualquier contrato de trabajo, tanto investigador, como laboral.

La instalación, en su PNT “Acceso y Uso del laboratorio”, contiene un apartado en el que se describe la actuación a llevar a cabo en caso de producirse una emergencia dentro de la propia sala de contención.



**NOTIFICACIÓN DE PRIMER USO DE INSTALACIONES PARA REALIZAR ACTIVIDADES DE  
UTILIZACIÓN CONFINADA CON ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

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

**I. RESPONSABLES DE LA INSTALACIÓN**

1) Entidad

Nombre:

Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes. Universidad de Zaragoza.

Dirección postal:

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Rosa Bolea Bailo

NIF: 72964847S

Cargo: Vicerrectora de Política científica en funciones

Tel: 976 761759

Correo electrónico: [vrinves@unizar.es](mailto:vrinves@unizar.es)

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Juan José Badiola Díez / Carlos Martín Montañés / Julián Pardo Jimeno

Cargo: Director del Centro / Profesores e investigadores de UNIZAR

Tel: 976 762947 / 976 761759

Correo electrónico: [badiola@unizar.es](mailto:badiola@unizar.es) / [carlos@unizar.es](mailto:carlos@unizar.es) / [pardojim@unizar.es](mailto:pardojim@unizar.es)

4) Responsable de bioseguridad de la instalación

Nombre y apellidos: Rosa Bolea Bailo

NIF: 72964847S

Cargo: Vicerrectora de Política científica en funciones

Tel: 976 761759

Correo electrónico: [vrinves@unizar.es](mailto:vrinves@unizar.es)



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

Prof. Juan José Badiola Díez

6) Existencia de comités de bioseguridad y/o Comité de Seguridad y Salud:

SI  NO

## I. DATOS GENERALES DE LA INSTALACIÓN

Deberá acompañarse un plano de situación, a escala 1:50.000 o similar, de forma que se identifique fácilmente su localización (urbana, suburbana o extraurbana).

1) Dirección de la Instalación:

Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes.

2) Nombre y formación del responsable de la sección:

Juan José Badiola Díez. Catedrático del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria y Director del Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes.

3) Descripción de las dependencias dentro de cada sección: laboratorios, cuartos de técnicas o equipos, oficinas, etc.

Se adjuntará plano de dichas dependencias: sección (es) o conjunto del edificio, a escala y con el detalle suficiente que permita apreciar las circunstancias relevantes en cada caso para la evaluación de riesgos.

El laboratorio (en adelante, laboratorio NCB3+; ver adjunto *Plano laboratorio NCB3+*) está ubicado en un edificio independiente que consta de varias salas, toda la instalación dispone de los requisitos de bioseguridad adecuados para este tipo de actividad. El acceso a dicha instalación es personal e intransferible.



#### IV. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD

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

Para actividades tipo 2, 3 y 4, en la que ya se haya presentado un Formulario Tipo A, es suficiente un listado de las actividades que se van a realizar.

Expansión del virus rSARS-CoV-MA15 con el fin de llevar a cabo los experimentos *in vivo* notificados y aprobados.

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

##### 3) Descripción de las operaciones:

###### 3.1. Microorganismos:

- |                         |                                     |                 |
|-------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| a) escala experimental  | <input checked="" type="checkbox"/> | Volumen máximo: |
| b) escala prueba piloto | <input type="checkbox"/>            | Volumen máximo: |
| c) escala industrial    | <input type="checkbox"/>            | Volumen máximo: |

###### 3.2. Número de Plantas:1

###### 3.3. Número de Animales:

##### 4) Periodo estimado de duración de la actividad

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

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

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

- Reglamento (CE) N° 1946/2003, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente. El formulario necesario para acompañar a los OMG en el transporte, puede encontrarse en el siguiente enlace: (<http://www.biodiv.org/biosafety/cop-mop/result.aspx?id=8288&lg=1>)
- Normativa nacional e internacional (OACI/IATA, OMI/MDG, TPF/RID y TPD/ADR) para el transporte de mercancías peligrosas y, en particular, de sustancias infecciosas y muestras para diagnóstico.



El transporte de los OMG a nuestro Centro se lleva a cabo mediante transporte específico para OMG tipo 3 siguiendo la legislación vigente en relación con dicho transporte, la documentación e identificación que establece dicha normativa.

En ningún momento el material infeccioso abandona la instalación BSL3.

## V. MEDIDAS DE CONFINAMIENTO Y OTRAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN APLICADAS

El objetivo de este apartado es la descripción completa de las condiciones de la instalación, con objeto de que la Comisión Nacional de Bioseguridad pueda evaluar si se garantiza el grado de confinamiento exigido por la legislación (ver anexo 3 de la Guía, que recoge el anexo II del Real Decreto 178/2004).

Si procede, se cumplimentará una hoja por cada una de las distintas secciones o departamentos interesados en la notificación. En ningún caso se aceptará que en un mismo formulario Parte B se incluyan distintos niveles de confinamiento.

<b>I.- LABORATORIOS</b>		
	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>
El laboratorio se encuentra separado de otras zonas del mismo edificio	X	
El laboratorio se encuentra en un edificio independiente	X	
El laboratorio es hermético, permitiendo que se fumigue	X	
Existencia de una entrada y salida independientes	X	
<b>Mobiliario y equipos</b>	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>
Superficies resistentes a agentes de descontaminación y de fácil limpieza	X	
Acceso al laboratorio a través de una esclusa	X	
Presión negativa respecto a la presión del medio ambiente inmediato	X	
Aire de entrada y de salida del laboratorio tratado con filtros HEPA	X	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Indicar el tipo de filtro HEPA:</li> </ul>	TROX TECHNIK F781	
Cabina de seguridad biológica	X	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Indicar el tipo y localización de la/s cabinas de seguridad biológica:</li> </ul>	Cabina BIOULTRA (Telstar)	
Autoclave	X	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Indicar la localización del autoclave (dentro del edificio; dentro del laboratorio, en otra dependencia de la instalación)</li> </ul>	Existen varios autoclaves dentro del edificio <sup>a</sup>	
<b>Normas de trabajo</b>	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>
Acceso restringido	X	



<ul style="list-style-type: none"> <li>¿Cómo se restringe el acceso? (ej. entrada mediante tarjeta del personal autorizado)</li> </ul>	Entrada mediante tarjeta del personal autorizado	
Señalización de peligro biológico en la puerta	X	
Señalización de peligro biológico en el equipamiento que aloja material biológico	X	
Medidas específicas para evitar la formación y difusión de aerosoles	X	
Indumentaria de protección	X	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Indicar qué indumentaria de protección y EPIs se utilizan</li> </ul>	Indumentaria de protección establecida en	
Lavado de la ropa de trabajo	X	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Indicar quien es responsable del lavado de la ropa de trabajo (empresa gestora; en la propia instalación)</li> </ul>	En la propia instalación	
Espacio específico para la ropa de trabajo (percheros; taquillas)	X	
Cambio de ropa y calzado antes de entrar y salir de la instalación	X	
El personal está obligado a ducharse antes de abandonar la zona controlada	X	
Control eficaz de roedores e insectos	X	
<b>Residuos</b>	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>
Inactivación de los OMG en el material contaminado y en los residuos	X	
Inactivación de los OMG en los efluentes de los lavabos, desagües, duchas o efluentes similares	X	
<b>Otras medidas</b>	<b>SÍ</b>	<b>NO</b>
Material para la recogida de posibles vertidos (vermiculita; papel absorbente) disponible en la zona de trabajo	X	
Almacenamiento de material fungible y reactivos en el propio laboratorio	X	
Ventana de observación o similar para ver a los ocupantes	X	

1) Adjuntar documentación relativa a protocolos de uso, validación y revisión periódica de equipos e instalaciones.

Para la elaboración de los protocolos de actuación en el laboratorio se han consultado unidades de contención similares a la nuestra. Existe empresa contratada por la Universidad para el mantenimiento preventivo, y de emergencia.

3) Indicar que otras normas internas (PNT) se aplican, tanto a la instalación como a la actividad o actividades que se desarrollan (exposición a agentes biológicos, experimentación con animales, gestión y eliminación de residuos, etc.)



Entre los protocolos indicados en el apartado anterior, existen protocolos de uso interno para el personal dentro el laboratorio en relación con la protección frente a la manipulación de agentes infecciosos, limpieza y retirada de residuos, así como para la actuación en caso de derrame accidental dentro y fuera de la CSB (ver adjunto *Protocolo de Normas de trabajo en el laboratorio NCB3+*).

La empresa que se encarga de la gestión de los residuos es [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED], de Gobierno de Aragón). Los residuos se extraen del laboratorio siempre dentro de contenedores de residuos biológicos homologados cerrados herméticamente, siguiendo el protocolo establecido (ver adjunto *Protocolo almacenaje, transporte y retirada de residuos*), almacenándose siempre dentro de la instalación BSL3 hasta su retirada por la empresa.

## VI. **PLANES DE EMERGENCIA**

Se deberá cumplimentar para todos los casos excepto para operaciones de utilización confinada de Tipo 1.

### 1) Información sobre prevención de accidentes y planes de actuación en situaciones de emergencia.

Además de los PNT y los protocolos de actuación en caso de derrame accidental referidos en puntos anteriores, existen planes de actuación ante diversas emergencias que han sido diseñadas y/o revisadas por la Unidad de Prevención de riesgos laborales de la Universidad, habiendo sido incluidas en el *Plan Autoprotección del Edificio*

### 2) Para instalaciones en las que se vayan a llevar a cabo operaciones de utilización confinada de tipo 3 y 4, deberá adjuntarse además la siguiente información:

- a) Riesgos específicos y potenciales debidos al emplazamiento.  
Ninguno
- b) Medidas preventivas aplicadas, tales como equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento.

Se aplican todas las medidas establecidas para BSL3 [REDACTED]

- c) Procedimientos y planes de comprobación de la eficacia permanente de las medidas de confinamiento.

Véase *Plan Autoprotección* adjunto.

- b) Descripción de la información suministrada a los trabajadores.

Véase formulario adjunto sobre *Aceptación normas de seguridad NCB3+*.

- c) Información necesaria para que la autoridad competente pueda evaluar los planes de respuesta en situación de emergencia elaborados de conformidad con el artículo 14 de la Directiva 98/81/CE.

Véase *Plan Autoprotección* adjunto.



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

**Nº de Notificación:**

**I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD**

- 1) Entidad  
Nombre: Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergente. Universidad de Zaragoza  
Dirección postal: Pedro Cerbuna, 12. Campus San Francisco, 50009 ZARAGOZA
- 2) Representante legal de la entidad  
Nombre y apellidos: Rosa Bolea Bailo  
NIF: 72964847S  
Cargo: Vicerrectora de Política científica en funciones  
Tel: 976 761759  
Fax:  
Correo electrónico: [vrinves@unizar.es](mailto:vrinves@unizar.es)
- 3) Responsable científico de la actividad  
Nombre y apellidos: Juan Jose Badiola, Diez, Carlos Martín Montañés, y Julián Pardo Jimeno  
NIF: 30040626G, 17866278Q y 25469556 T  
Cargo: Profesores e investigadores de la UNIZAR  
Tel: 976 761759  
Fax:  
Correo electrónico: [badiola@unizar.es](mailto:badiola@unizar.es), [carlos@unizar.es](mailto:carlos@unizar.es), [pardojim@unizar.es](mailto:pardojim@unizar.es)
- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad  
Nombre y apellidos: Rosa Bolea Bailo  
NIF: 72964847S  
Cargo: Vicerrectora de Política científica en funciones  
Tel: 976 761759  
Fax:  
Correo electrónico: [vrinves@unizar.es](mailto:vrinves@unizar.es)
- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: Los tres

**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:

- Expandir el virus rSARS-CoV-MA15 con el fin de llevar a cabo los experimentos in vivo notificados y aprobados anteriormente en **A/ES/20/99**.

### 2. Duración prevista de la actividad:

Noviembre 2020 – Diciembre 2025

*(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 organismo receptor en todo momento es un OMG,. Es un virus rSARS-CoV obtenido por sustitución de bases, para generar una cepa recombinante (rMA15) adaptada a ratón y que permite estudiar la interacción con el hospedador y la virulencia de dicho virus en un modelo in vivo, así como analizar la eficacia de diferentes tratamientos incluyendo vacunas. Par su obtención se llevaron a cabo estrategias similares a las que se han utilizado previamente en el equipo de Luis Enjuanes (Nieto-Torres J.L. et al, 2014, PLoS Pathog. 10: e1004077; Jimenez-Guardeño J.M.et al, 2014, PLoS Pathog. 10: e1004320). En concreto para la generación del mutante MA15 adaptado a ratón se introdujeron las mutaciones dentro de Nsp5 (H133Y, K268N), Nsp9 (T67A), Nsp13 (A4V), S protein (Y436H), y M protein (E11K), generándose así la cepa rMA15 como se describe en Fett et al. J Virol . Estas mutaciones se basaron en las descritas para la cepa no recombinante MA15 que se generó mediante infecciones consecutivas en ratones Balb/c (Roberts A, et al 2007. e) PLoS



Pathog). Al contrario que la cepa original SARS-CoV aislada de humanos la cual no es virulenta en ratones, la cepa rMA15 mostraba alta virulencia en ratones envejecidos.

Se obtuvieron distintos clones de BACs que contenían uno o varios genes virales modificados, a partir de los cuales se rescataron los virus modificados

El OMG es idéntico al virus silvestre SARS-CoV aislado de pacientes excepto en los dos marcadores genéticos, se espera que sea patógeno para humanos, dado que el virus wt (SARS-CoV) produce enfermedad respiratoria severa en seres humanos

Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal. El OMG es idéntico al virus silvestre SARS-CoV aislado de pacientes excepto en los dos marcadores genéticos, se espera que sea patógeno para humanos, dado que el virus wt (SARS-CoV) produce enfermedad respiratoria severa en seres humanos

b) Efectos para el medio ambiente.

El OMG no existe en la naturaleza, se generó en el laboratorio y en todo momento permanecerá confinado dentro de las instalaciones. El virus silvestre genero un brote iniciado en China en noviembre de 2002 que la OMS declaró concluido en agosto de 2003. Desde entonces no se ha detectado su presencia en la población humana. Es un virus zoonotico, siendo su origen el murciélago y las civetas que actuaron como animal hospedador intermedio. Este virus, aunque son patógenos para humanos, no causan enfermedad en los animales hospedadores intermedios.

El virus deficiente en propagación, ya que tiene delecionados los genes 3 y E, es incapaz de salir de la célula una vez que ha entrado. Si accidentalmente se propagara por el aire, podría sobrevivir en el medio ambiente, dentro de los humanos, pero no se propagaría a otros seres por ser defectivo. No serán patógenos para animales, tampoco para humanos, ni plantas puesto que no puede entrar en ellas al no tener estas los receptores apropiados

2) Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

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

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

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

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



La actividad se llevará a cabo en un laboratorio de cultivo celular NCB3 diseñado específicamente para el trabajo con SARS-CoV-2 con la asesoría de Gonzalo Pascual (CISA-INIA).

Este laboratorio se sitúa dentro de las instalaciones NCB3 del Centro de Encefalopatías por lo que existe un nivel adicional de contención.

Este laboratorio cuenta con cabina de seguridad biológica (CBS) de clase II, estufa de cultivo, centrifuga y microscopio con el fin de minimizar al máximo los riesgos fuera de esa área.

El OMG se cultivará, titulará en el NCB3, por lo tanto, está confinado allí y únicamente se trasladará en contenedor de triple envase, previamente desinfectado en su exterior.

El acceso al NCB3, está disponible únicamente al personal autorizado. El acceso se realiza a través de esclusa. Existe vestuario interior para limpio/sucio

Ducha de descontaminación, Vigilancia tanto en el laboratorio como en el box mediante ventana de observación

Doble filtración HEPA en el aire de extracción

Filtración en el aire de impulsión

Tratamiento de efluentes

Suministro eléctrico independiente para el NCB3, y grupo electrógeno para equipos.

Control de parámetros de biocontención de la instalación, conectado a sistema de alarma

La CBS se valida anualmente, y se verifica su funcionamiento antes de cada experimento.

La Universidad, por medio de su servicio de prevención, ha actualizado este año el plan de autoprotección del edificio, contemplando las posibles emergencias y planes de evacuación.

- 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 cultivo de los virus se realizará en células VERO E6, y el personal expuesto será el menor número posible, todo ello en el laboratorio en condicione de contención de nivel 3, EPIS, presión negativa, filtración aire, recogida residuos, autoclave, desinfección, etc.



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

Grado 3, para actividad de riesgo en condiciones de confinamiento tipo3

- 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.)

Zaragoza está situado en el centro del valle del Ebro. Temperaturas calurosas en verano, llegando a alcanzarse hasta los 40° en días puntuales, y frío ligero en invierno, llegando a mínimas de -2 -3°C puntualmente. Viento a rachas con una frecuencia del 40% y una velocidad media de 30km/hora.

El edificio cuenta con instalaciones destinadas a Administración fuera de la zona de contención.

- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente. Ver anexos
- c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales. Ver anexos
- d) Planes de emergencia. Adjuntamos documento “plan de emergencias Edificio Encefalopatías, Fac. Veterinaria. Universidad de Zaragoza Ver anexo 3