



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

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Responsables de la actividad

a. Entidad

Nombre: Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA); Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA); Ministerio de Ciencia e Innovación

Dirección postal: Carretera de Algete a El Casar de Talamanca s/n; Valdeolmos - Alapardo; 28130 Madrid)

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Esther Esteban Rodrigo

NIF: 05271582M

Cargo: Directora del INIA

Tel: 913473900

Correo electrónico: esther.esteban@inia.csic.es

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Juan Pedro Lapuente Fernández

NIF: 25444221B

Cargo: CSO del Laboratorio LivingCells del Hospital Universitario de Fuenlabrada

Tel: 661976328

Correo electrónico: p.lapuente@peaches.es

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

Nombre y apellidos: Laura Pérez Palancar

NIF: 53043241C

Cargo: Jefe de Área de Animalario y Seguridad Biológica

Tel: 916202300

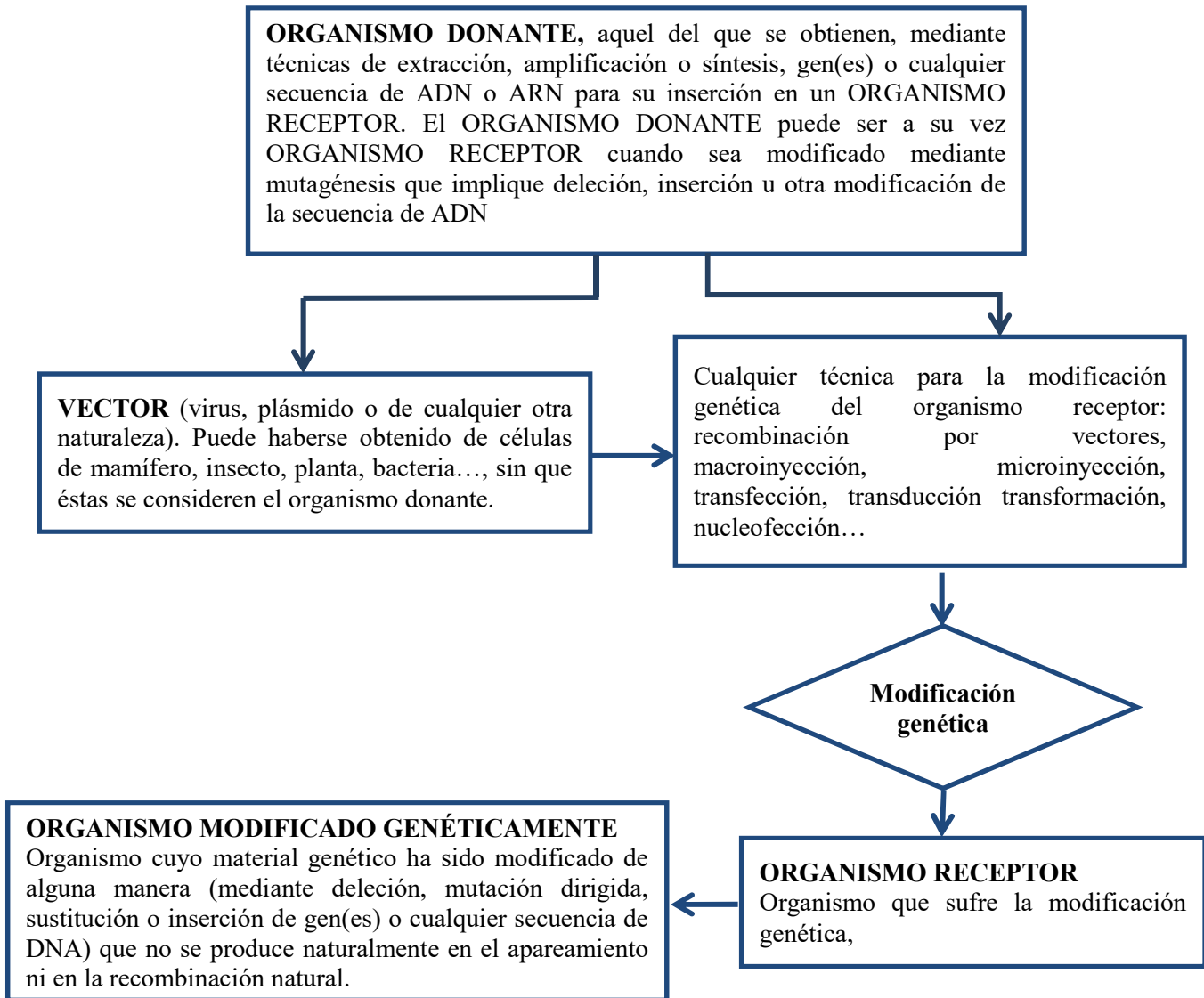
Correo electrónico: Laura.perez@inia.csic.es

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

f. Juan Pedro Lapuente Fernández



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





II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

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

SI NO

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

- Nombre de la convocatoria:

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

- Organismo financiador:

Otro tipo de financiación²

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

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

A/ES/00/I-01

- Fecha de autorización de la instalación:

04/12/2001

Si el OMG no se genera en la instalación³:

- Nombre de la instalación de origen del OMG:

Charles River (Francia)

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

Existe autorización de uso de instalación tipo 3. La instalación de tipo 3 del CISA-INIA (notificación A/ES/00/I-01), en la que se va a llevar a cabo la actividad, ya ha sido autorizada con anterioridad por el Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente (CIOMG) mediante resolución con fecha 04/12/2001

¹TASAS

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

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

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

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

A/ES/00/I-1.

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

El tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación seguirán la legislación internacional y vigente para el transporte de animales modificado genéticamente.

3. Finalidad de la actividad:

El objetivo de este estudio es investigar la eficacia y seguridad de un medio condicionado en el tratamiento y prevención de la tormenta de citoquinas utilizando un modelo humanizado de ratones ACE2 infectados por vía intranasal con SARS-COV-2. El modelo animal consiste en ratones transgénicos B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J o K18-hACE2, que expresan la proteína ACE2 humana (hACE2) que actúa como receptor de SARS-CoV-1-2002 y SARS-CoV-2-2019, bajo el promotor de citoqueratina 18 (K18) humano, que dirige la expresión del transgen a las células epiteliales de las vías respiratorias (el principal órgano diana del SARS-coV-2), así como también en el epitelio de otros órganos internos. Los resultados esperados son ver que se reduzcan los niveles de citoquinas proinflamatorias en el suero y los tejidos de los ratones, lo que conllevará una disminución del daño tisular y de la carga viral. Prevemos que los ratones tratados con el medio condicionado tendrán una mayor tasa de supervivencia y una mejor función respiratoria en comparación con el grupo de control, mostrando una menor gravedad o no mostrando lesiones pulmonares relacionadas con el proceso inflamatorio. El OMG que se va a utilizar es un ratón transgénico comercial. Se trata de ratones transgénicos B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J o K18-hACE2 (Stock No: 034860) procedentes de laboratorios Jackson (<https://www.jax.org/strain/034860>), que expresan la proteína ACE2 humana (hACE2) que actúa como receptor de SARS-CoV-1-2002 y SARS-CoV-2-2019, bajo el promotor de citoqueratina 18 (K18) humano, que dirige la expresión del transgen a las células epiteliales de las vías respiratorias (el principal órgano diana del SARS-coV-2), así como también en el epitelio de otros órganos internos.

- ORGANISMO DONANTE: Homo Sapiens. Secuencia que codifica el receptor humano ACE2
- ORGANISMO RECEPTOR: Mus Musculus
- ORGANISMO MODIFICADO RESULTANTE: Ratón Transgénico B6.Cg-Tg(K18- ACE2)2Prlmn/J Es un OMG comercial descrito en la siguiente publicación. McCray PB Jr, Pewe L, Wohlford-Lenane C, et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Virol. 2007;81(2):813-821. doi:10.1128/JVI.02012-06

4. Clasificación de la actividad:

(Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y el anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados

⁴ Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

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



genéticamente, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las Notas de orientación para la evaluación del riesgo).

Tipo 3

Tipo 4

III. INFORMACIÓN RELATIVA A LA OBTENCIÓN DEL OMG

1. Organismo receptor del cual deriva el OMG:

Células humanas/primates Detallar las líneas celulares:

Células: otras Detallar las líneas celulares:

Animal

Planta

Bacteria

Hongo

Virus

Protozoos

-Especificar el nombre científico y común:

Mus Musculus (Ratón)

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

i) Técnicas de aislamiento: Se trata de una línea de ratón genéticamente alterada B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J, susceptible a la infección experimental por SARS CoV-2 y distribuida comercialmente por Jackson Laboratories con la referencia 034860 <https://www.jax.org/strain/034860>

ii) Técnicas de identificación:

iii) Marcadores genéticos: Son ratones transgénicos que sobreexpresan el receptor de ACE2 humano.

iv) Marcadores fenotípicos: No aplica

v) Estabilidad genética: Si

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

SI

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

NO

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

c. Modificación genética anterior:

SI



– Describir:

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

NO X

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

SI

Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros



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

NO

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

SI NO

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

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

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

SI Podría sobrevivir en el medio como cualquier otro ratón

- Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

esporas

endosporas

quistes

esclerocios

esporas asexuales (hongos)

esporas sexuales (hongos)

otros, especifíquese

NO

ii) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

iii) Posibles nichos ecológicos:

iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

h. Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

El ratón K18-hACE2 es un posible transmisor del virus SARS-CoV-2 a otras especies susceptibles a la infección si llegara a infectarse con él en el medio natural. En cambio, en el animalario de nivel de bioseguridad 3 donde se realizarán las infecciones con SARS-CoV-2 es imposible que se liberen al medio ambiente porque son todos ellos sacrificados al final del experimento.

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

Distribución mundial en ecosistemas terrestres.

j. Hábitat natural del organismo:

Prácticamente en cualquier hábitat, desde bosques tropicales y praderas hasta desiertos de climas áridos.

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

Humanos	X
Animal	<input type="checkbox"/>
Planta	<input type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Virus	<input type="checkbox"/>
Protozoos	<input type="checkbox"/>

-Especificar el nombre científico y común:

Homo Sapiens (Humano)

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI NO X

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

SI X

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

NO

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

c. Modificación genética anterior:

SI

– Describir:

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



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

SI Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros

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

NO

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

SI NO

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

- g.** Método de obtención:

– Extracción

– PCR

– Síntesis *in vitro*

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

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



IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

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

Modificar el ratón para hacerlo susceptible a algunos coronavirus incluyéndose el SARS-CoV-2.

2. Tipo de modificación genética:

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

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

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

Otros, especifique:

Se realizó mediante inyección en los pronúcleos.

McCray PB Jr, Pewe L, Wohlford-Lenane C, et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol.* 2007;81(2):813-821. doi:10.1128/JVI.02012-06.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

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

Vector pK18mTElacZ-K18i6x7pA según describen los creadores en McCray y col. *J of Virol*, 2007

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

La secuencia codificante del gen hACE2 es la responsable de la expresión de la proteína utilizada por diferentes coronavirus como puerta de entrada a las células que infectan. Las regiones correspondientes al gen K18 humano son necesarias para impulsar la expresión específica de ACE2 en células epiteliales. La secuencia del virus del mosaico de la alfalfa tiene como función potenciar la traducción (TE)

ii) Si se trata de virus:

- Es defectivo en replicación SÍ NO



- Indicar cómo se obtiene el vector viral. Si se utilizan plásmidos para su obtención aportar mapa de restricción del/los plásmidos. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes.

- b.** Gama de hospedadores del vector:

- c.** 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 de la secuencia insertada, delecionada o modificada.

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

La secuencia codificante de hACE2 es aquella correspondiente a la proteína que se quiere expresar. Las regiones correspondientes al gen K18 humano son necesarias para impulsar la expresión específica de ACE2 en células epiteliales.

- b.** Información sobre los genes estructurales:

El inserto contiene la secuencia codificante de hACE2 (CDS), clonado en una construcción que contenía regiones genómicas 5' y 3' del gen K18 humano. La región genómica K18 5' consta de una secuencia genómica aguas arriba de 2,5 kb, el promotor y el primer intrón del gen K18 humano, mientras que la región K18 3' consta del exón 6, el intrón 6, el exón 7 y ~300 pb. de la UTR 3' del gen K18 humano, incluida la señal poli (A) de K18. Inmediatamente aguas arriba del codón de inicio hACE2 hay una secuencia potenciadora de la traducción (TE) del virus del mosaico de la alfalfa.

- c.** Información sobre los elementos reguladores:

- d.** ¿Ha sido secuenciada?

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

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

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



a. Si el vector es un plásmido

i) Se pierde

ii) Se inserta en el genoma

- Aleatoriamente

- En un sitio definido

o Localización cromosómica:

o Secuencias colindantes:

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

iii) Se mantiene en forma episómica

- Número de copias:

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

b. Si el vector es un virus:

i) Se mantiene en forma episómica

ii) Se inserta en el genoma

- La inserción se produce al azar

- La inserción es específica

o Localización cromosómica:

o Secuencias colindantes:

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

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

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

i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)



ii) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

iii) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)



V. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG)

1. Descripción del OMG final

El OMG utilizado es un ratón comercial transgénico para ACE2 humano, B6.Cg-Tg(K18- ACE2)2PrImn/J (Stock No. 034860). La generación del ratón está descrita: McCray PB Jr, Pewe L, Wohlford-Lenane C, et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Virol. 2007;81(2):813-821. doi:10.1128/JVI.02012-06

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

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

NO

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

NO

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

NO

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

NO

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

NO

- f. Marcadores específicos del OMG:

gen ACE2 humano

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

Es una línea estable comercializada

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

NO

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

- a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

PCR

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

Trampas para roedores



VI. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

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

Generación del modelo SIRS mediante la infección por instilación nasal de 1×10^4 PFU de SARS COV-2 embebidos en 50uL de PBS, previa anestesia inhalatoria con isoflurano. Este procedimiento afecta a todos los grupos, excepto al grupo control. Inmediatamente después de haber realizado la instilación nasal del virus, se realizará el primer tratamiento mediante infiltración intravenosa a través de la vena de la cola de 40uL totales, o bien de suero fisiológico (vehículo) en el grupo control +, de hidrocortisona soluble en el caso del grupo control GS, o bien de PRS CK STORM a la dosis prevista en cada grupo (grupos A-C y Grupo control GS). Al minuto y a las 3 horas y de haber realizado el tratamiento, se extraerán 60uL de sangre venosa de la vena submandibular izquierda, derecha, respectivamente a todos los ratones de todos los grupos mediante el uso de lanceta (vena submandibular) o aguja de 25 Gs (vena safena). La administración del tratamiento y subsecuentes colecciones de sangre se realizarán al resto de subgrupos igualmente durante un total de 5 días, a razón de subgrupo por día. Tras cada día cada subgrupo será sacrificado, a excepción de los ratones pertenecientes al subgrupo 5 del grupo C, numerados con 297, 298, 307 y 308; a estos ratones se les incluye en un grupo recovery para ser sacrificados a las 120h de haber realizado el último tratamiento. Dicho sacrificio se realizará mediante la exposición a CO_2 o mediante dislocación cervical previa sedación profunda con isoflurano y se confirmará la muerte mediante exanguinación completa. Tras ella se tomarán de muestras de los principales órganos. Todos los procedimientos se realizarán siempre bajo inducción anestésica previa con Isoflurano al 4-5% en cámara de inducción anestésica, con un flujo de oxígeno de 0,5-1L/mn. Los OMG serán manejados con procedimientos acordes al nivel de esta segunda instalación. Así, todas las manipulaciones (inoculación, extracción de órganos, necropsias) se realizarán en campanas de bioseguridad IIA situadas dentro del laboratorio de nivel de biocontención tipo 3. Los animales infectados se mantendrán en jaulas ventiladas en presión negativa con entrada y salida a través de filtros HEPA. La manipulación se realizará siempre por personal especializado y entrenado para el trabajo con este tipo de virus.

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

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

- i) Para preparación de lotes

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

- b. Número aproximado de plantas por ensayo:

- c. Número aproximado de animales por ensayo:

3. Naturaleza de las operaciones:

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

4. Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

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



Del 1 de Mayo del 2023 al 30 de Diciembre del 2023

VII. EVALUACIÓN DE RIESGO

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

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

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

- a. Organismo receptor.

Mus Musculus

- b. Organismo donante.

Homo Sapiens

- c. Inserto.

El gen que codifica para el receptor ACE2 humano. Descritos en McCray PB Jr, Pewe L, Wohlford-Lenane C, et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Virol. 2007;81(2):813-821. doi:10.1128/JVI.02012-06.

- d. Vector.

Vector pK18mTElacZ-K18i6x7pA según describen los creadores en McCray PB Jr, Pewe L, Wohlford-Lenane C, et al. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Virol. 2007;81(2):813-821. doi:10.1128/JVI.02012-06.

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

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

El ratón K18-hACE2 es un posible transmisor del virus SARS-CoV-2 a y puede afectar a la salud humana si un ratón infectado, experimentalmente o en la naturaleza, entra en contacto directo sin la protección de los equipos de protección individuales (EPI) que incluyen el uso de capuces con ventilación motorizada. También puede afectar a la salud de especies animales susceptibles a la infección. No afecta a la salud de las plantas.

- b. Efectos para el medio ambiente.

Es muy improbable que se liberen al medio ambiente. Teóricamente podría suponer un aumento en la probabilidad de la propagación del virus de forma natural entre especies animales susceptibles a SARS-CoV-2

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

Los ratones se aclimatarán directamente en el rack ventilado del box de nivel NCB3+. Para ser infectados con SARSCOV-2 mediante instilación nasal de 104 PFU/ratón, y serán manejados con procedimientos acordes al nivel de esta segunda instalación. Así, todas las manipulaciones (inoculación, extracción de órganos, necropsias) se realizarán en campanas de bioseguridad IIA situadas dentro del laboratorio de nivel de biocontención tipo 3+. Los animales infectados se mantendrán en jaulas ventiladas en presión negativa con entrada y salida a través de filtros HEPA.

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



La manipulación se realizará siempre por personal especializado y entrenado para el trabajo con este tipo de virus. El box de animalario de nivel NCB3+ cuenta con impulsión y extracción de aire controladas para proporcionar gradiente de presión negativa. Los sistemas de climatización están dotados con filtros HEPA tanto al interior como al exterior. Antesala y vestuario (con ducha) para la salida de la barrera de contención y colocación vestimenta específica de uso en la sala. Los ratones se estabulan en jaulas ventiladas en presión negativa con entrada y salida a través de filtros HEPA. Campana de bioseguridad IIA para las manipulaciones. La salida de material no descontaminable se realizará a través de cubos de residuos, los cuales serán gestionados posteriormente de acuerdo a su nivel de riesgo.

Posteriormente el box y el resto de material descontaminable se descontaminan mediante el uso de peróxido de hidrógeno. Además, todo el personal, experto, cualificado y entrenado en el manejo de patógenos de riesgo biológico, entrará a las instalaciones siguiendo las normas de seguridad del laboratorio y equipados con equipos de protección personal que garanticen una elevada protección de las vías respiratoria y cutánea. Por último indicar que el CISA-INIA comunicó por primera vez el uso de agentes biológicos de tipo III a la autoridad laboral el 18/08/2003.

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

El laboratorio y animalario de nivel 3 del CISA presenta acceso restringido al personal ajeno al proyecto. La zona de contención biológica de 10.824 m², posee unas características arquitectónicas y funcionales reconocidas internacionalmente para garantizar la bioseguridad. La característica principal del laboratorio es proporcionar un grado de estanqueidad total para evitar la liberación al exterior de cualquier agente patógeno sobre el que se estén llevando a cabo trabajos de investigación. Para asegurar unas correctas medidas de seguridad, el Centro está diseñado siguiendo aspectos arquitectónicos, funcionales y buenas pautas de trabajo adecuados e integrados. Dentro de los aspectos arquitectónicos y estructurales, el Centro está construido en hormigón armado hidrófugo, cuyo interior está pintado con pintura epoxídica para posibilitar las operaciones de descontaminación. Existen también ventanas blindadas de seguridad. Todas las entradas a boxes y diferentes zonas o laboratorios, así como las de emergencia, presentan puertas con cerradura de seguridad y ajuste neumático. El Centro presenta una estructura tipo “sándwich” donde las zonas de trabajo (laboratorios, animalario y entrada y salida de personal) se localizan en una planta intermedia.

En la planta superior se encuentra un sistema de filtración de alta eficacia del aire mientras que la planta inferior está habilitada para los procesos de gestión de residuos sólidos y efluentes y para la entrada y salida de animales y materiales mediante sistemas SAS y airlocks. Para asegurar un funcionamiento correcto incluso bajo situaciones de emergencia, todos los dispositivos de seguridad se encuentran instalados de forma redundante. El aire de salida es filtrado mediante un sistema simple o doble seriado de filtros H14 HEPA (High Efficiency Particulate Air) consistente en una malla filtrante con paso de poro de 99.995% para partículas de máximo poder de penetración en superficie (MPPS) (0.12 µm-0.20 µm). Existen diferentes zonas de filtración de salida independientes, correspondientes a distintas secciones del laboratorio; de esta forma en caso de problemas puede evaluarse la efectividad de la zona afectada por separado.

El control y tratamiento de residuos líquidos generales tiene lugar en la planta inferior del Centro. Con carácter previo se realiza una separación del 100% de los sólidos conformados presentes en el efluente y el 50% de los sólidos en suspensión. Posteriormente se trata el efluente mediante una esterilización fisicoquímica en 3 reactores de 3 m³ controlando temperatura, presión y pH. La



temperatura se eleva por encima de 136°C durante un tiempo aproximado de 22 minutos. La fase química se realiza mediante la inyección de peróxido de hidrógeno durante el tratamiento térmico. Existe un sistema adicional de tratamiento de efluentes en casos de emergencia por tratamiento químico.

Para el control y tratamiento de sólidos biocontaminados existen diferentes autoclaves de vapor y la presencia de sistemas de descontaminación química (SAS o airlocks) a base de peróxido de hidrógeno gas o mediante ducha química superficial.

A pesar de todos los recursos tecnológicos y de ingeniería, el buen funcionamiento del área de biocontención se culmina con una correcta actuación del personal trabajador correctamente formado, adoptando de forma obligada medidas de prevención de riesgos laborales. Controles de entrada y salida del laboratorio. La entrada al laboratorio está controlada y supervisada rigurosamente. Sin acreditación correspondiente, no está permitido el acceso. Una vez en el interior es necesario pasar por un vestuario para liberarse de toda la ropa y objetos personales antes de acceder a la zona biocontenida. El acceso a la zona de Alta Contención Biológica (NCB3), presenta un riesgo especial para los trabajadores por lo que a esta zona sólo puede acceder personal especialmente formado y autorizado para trabajar en estas condiciones. Una serie de vestuarios a la entrada y duchas a la salida aseguran la descontaminación obligatoria del personal. Cada persona que abandone el laboratorio deberá seguir escrupulosamente unas pautas de descontaminación, entre las que se incluye el arrastre y dilución gracias a la toma de una ducha automática de agua de 3 minutos de duración. Bajo ningún concepto es posible extraer cualquier objeto del interior del laboratorio sin la descontaminación pertinente.

Cumplimiento de procedimientos de trabajo y seguridad. Resulta imprescindible por parte de los trabajadores, el cumplimiento de los procedimientos de trabajo (métodos, procedimientos normalizados de trabajo, instrucciones par aseguramiento de calidad, etc.) existentes y por lo tanto la información sobre los riesgos de los productos y operaciones, y las medidas de seguridad y protección a aplicar. Dentro de ellas, está especialmente controlado el uso obligatorio de equipos de protección individual (EPI), para evitar de forma accidental, inhalaciones, ingestiones, cortes, pinchazos, arañazos, mordeduras o picaduras cuando se enfrentan a situaciones especiales de riesgo biológico.

De igual manera y en cumplimiento de la legislación vigente, los trabajadores que vayan a desarrollar cualquier actividad en la zona de biocontención, se encuentran obligados a recibir formación para el desarrollo de sus tareas que incluyen los siguientes aspectos: agentes biológicos a los que están expuestos y grupo de riesgo al que pertenecen, prácticas de trabajo seguras, características y uso correcto de los equipos de protección individual [R.D. 664/1997].

Establecimiento de cuarentenas. Finalmente, y en cumplimiento de la legislación y normativa internacional de la OMSA y la FAO, todo trabajador de la zona de Contención está sujeto a cuarentenas especiales entendiéndolas como el espacio de tiempo que transcurre entre el abandono de la zona de Riesgo y todo contacto con animales sensibles de contraer enfermedades desarrolladas/reproducidas en el Centro. Estas cuarentenas varían entre los 3 y 5 días como mínimo. De igual manera que con los equipos de protección individual, el trabajador deja constancia documental de cumplimiento de esta circunstancia.



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

1. Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Cumplimiento de procedimientos de trabajo y seguridad. Resulta imprescindible por parte de los trabajadores, el cumplimiento de los procedimientos de trabajo (métodos, procedimientos normalizados de trabajo, instrucciones par aseguramiento de calidad, etc.) existentes y por lo tanto la información sobre los riesgos de los productos y operaciones, y las medidas de seguridad y protección a aplicar. Dentro de ellas, está especialmente controlado el uso obligatorio de equipos de protección individual (EPI), para evitar de forma accidental, inhalaciones, ingestiones, cortes, pinchazos, arañazos, mordeduras o picaduras cuando se enfrentan a situaciones especiales de riesgo biológico. Para ello el trabajador es formado, informado y acepta dejando constancia documental del cumplimiento de las normas y cuarentenas establecidas (se adjunta formato), destacando las siguientes:

- * Las normas que señalan la protección de las heridas y lesiones de las manos antes de iniciar la actividad laboral.
- * Las normas que limitan o prohíben el trabajo directo con animales y/o manejo de equipos contaminados al personal que presenta lesiones cutáneas que no se pueden cubrir.
- * La utilización constante de guantes de protección en la manipulación de muestras biológicas, objetos, materiales o superficies contaminadas con fluidos biológicos, etc.
- * La prohibición de comer, beber, fumar, aplicarse cosméticos o llevar lentes de contacto en las áreas de trabajo.
- * La obligación del uso de batas de protección, mascarillas y protección ocular (entre otras) en aquellas operaciones que pueden implicar salpicaduras de sangre o fluidos.
- * El seguimiento estricto de las instrucciones que contemplan la actuación en caso de accidente o incidente en el que intervenga la presencia de un agente biológico.
- * El seguimiento de las situaciones de riesgo adicional que podría suponer a aquellos trabajadores especialmente sensibles (patologías previas, trastornos inmunitarios, embarazo, lactancia, discapacidad, etc.).
- * El uso de ropa de trabajo especial como pijamas, camisetas, monos, ropa interior, zuecos o zapatillas, botas, etc.
- * El cambio de ropa en los accesos y salidas a la zona de alta seguridad.

2. Formación del personal adscrito:

De igual manera y en cumplimiento de la legislación vigente, los trabajadores que vayan a desarrollar cualquier actividad en la zona de biocontención, se encuentran obligados a recibir formación para el desarrollo de sus tareas que incluyen los siguientes aspectos: agentes biológicos a los que están expuestos y grupo de riesgo al que pertenecen, prácticas de trabajo seguras, características y uso correcto de los equipos de protección individual [R.D. 664/1997].

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



3. Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Ver punto 4.

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

El Centro cuenta con un equipo de mantenimiento que trabaja durante las 24 horas del día todos los días del año para velar por el mantenimiento adecuado de los sistemas de confinamiento y protección del centro. Este equipo de mantenimiento se complementa con el Equipo de Seguridad Biológica velando por la vigilancia del cumplimiento de todas las medidas de confinamiento y protección con las que cuenta el Centro y el personal del mismo.

El laboratorio está equipado con medios e infraestructura de biocontención superiores a los establecidos para las operaciones confinadas de Tipo 3, en la legislación de aplicación y normativas nacionales e internacionales. La Instalación se encuentra validada por empresa externa, inspeccionada y declarada como nivel 3 de contención biológica por el Instituto Regional de Seguridad y Salud en el Trabajo de la CAM, auditada interna y externamente en riesgo biológico por empresas ajenas, cualificada anualmente por empresa especializadas en CSB y filtración y verificada por el equipo propio de seguridad biológica periódicamente de forma rutinaria y frente a operaciones de mantenimiento correctivo. Se dispone de procedimientos de bioseguridad por actividades tales como, investigadores, animalario, seguridad biológica, mantenimiento, limpieza, vigilancia perimetral y equipo médico, donde se especifican las normas de bioseguridad para descontaminaciones, gestión de residuos, operaciones de mantenimiento correctivo, envíos y recepción de muestras, transporte interior, uso de airlocks y SAS, etc. Se dispone de un programa mensual, bimestral, trimestral, cuatrimestral, semestral y anual de actuaciones de verificación y seguimiento de instalaciones críticas. Se dispone de documentos de control de acciones, trabajos y seguimiento de parámetros de bioseguridad. Se dispone de estación informática de control y seguimiento de parámetros esenciales de bioseguridad e infraestructura de mantenimiento redundante (interior NCB3- exterior). Se dispone de estación informática de seguimiento de parámetros para tratamiento de efluentes redundante (interior NCB3 y exterior). Se dispone de redundancia en suministro eléctrico con dos líneas de alta tensión, dos transformadores de baja autoconmutados, dos grupos electrógenos y dos UPS /SAI.

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

Consultar medidas anteriormente descritas y recogidas en la autorización del centro.

IX. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1. Encargado de la gestión de residuos:

a. Gestión interna: SÍ NO

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

Limpieza: Se dispone de personal entrenado específico de limpieza tanto para áreas NCB3 comunes como específicas donde se cuenta con la colaboración de personal especializado en bioseguridad. Se dispone de personal entrenado y acreditado en trabajos de animalario. Se dispone de procedimientos de desinfección, descontaminación y esterilización que son llevados a cabo por personal técnico especializado en bioseguridad (Técnicos Superiores de Laboratorio y Titulados Superiores en Ciencias).

b. Gestión por una empresa externa: SÍ NO



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

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA

1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Indicadas en el plan de evacuación del centro.

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

El acceso al laboratorio es restringido por huella. El laboratorio se encuentra en depresión respecto a las zonas contiguas, ésta se consigue tras sucesivas caídas de presión en cada una de las esclusas de acceso al laboratorio de contención. Cuentan con una ducha de descontaminación en una esclusa para la salida de la barrera de contención. Para la manipulación de agentes biológicos se dispone de una cabina de seguridad biológica. Dispone de autoclave y de SAS. Los residuos líquidos son tratados en un sistema de tratamiento de aguas antes de su vertido al exterior. Existe un control desde el exterior mediante cámara de video vigilancia y de un teléfono. Disponen de un botiquín dentro del laboratorio

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

Todos los trabajadores recibirán por escrito el Plan de Acogida al CISA-INIA y formación específica para el trabajo en condiciones P3

4. Planes de emergencia y contingencia:

La instalación dispone de un plan de emergencias de actuación en caso de accidente biológico y plan de evacuación sobre incidentes en incendios, aviso de bomba, accidente biológico químico y evacuación de accidentados.

- 1) Condiciones en las que podría producirse un accidente: Indicadas en el Plan de Evacuación establecido.
- 2) Equipamiento de seguridad (especifíquese): Reflejados en los procedimientos detallados anteriormente.
- 3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores: Manual de bioseguridad para animalario. Plan de Evacuación. Procedimientos de Bioseguridad específicos en animalario.
- 4) Planes de emergencia: Presentado en Protección Civil y expuesto en el acceso a la zona NCB3 para información a personal específico. Las acciones técnicas son llevadas a cabo por personal CISA-INIA de Dirección, de Seguridad Biológica y de Mantenimiento.