



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

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
------------------------	----------------------------

I. INFORMACIÓN GENERAL

A. Notificador

1) Nombre y titulación del responsable de la notificación:

Dr. Luis Enjuanes Sánchez
Profesor de Investigación (CSIC). Doctor en Química.

2) Centro, Institución o Empresa:

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

3) Domicilio:

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)
Campus Universidad Autónoma. Cantoblanco
28049-Madrid

4) Persona de contacto:

Fernando Usera Mena
Responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica

Tel: 915854541
Fax: 915854506
Correo electrónico: fusera@cnb.uam.es



B. Instalación donde se va a desarrollar la operación de utilización confinada (sí previamente ha sido comunicada para este tipo de operaciones):

1) Fecha de comunicación de la notificación relativa a la instalación:

7/03/01

2) Número de Notificación:

A/ES/00/I-8

C. Información sobre el personal y su formación (Titulación y experiencia en el sector):

1) Responsable de la actividad de utilización confinada objeto de la notificación:

Dr. Luis Enjuanes Sánchez, jefe del laboratorio 114 del CNB
Profesor de investigación del CSIC, con 20 años de experiencia en la investigación sobre coronavirus.

2) Responsables de la vigilancia y/o control (sólo en el caso que sean diferentes que los notificados para el caso de las instalaciones):

Fernando Usera Mena, Doctor en Ciencias. Investigador Titular de Organismos Públicos de investigación. Responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica del CNB desde 1993.



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

Construcción segura de replicones o replicones encapsidados (pseudoviriones) altamente atenuados basados en el coronavirus SARS-CoV con objeto de utilizarlos en el estudio de las bases moleculares de la replicación de SARS-CoV y como herramienta para el estudio de antivirales y vacunas. Hay que tener en cuenta que algunos de estos pseudoviriones se han rescatado con un título unas 1000 veces menor al virus SARS-CoV, por lo que estarán altamente atenuados in vivo.

2) Clasificación de la actividad conforme al artículo 5 y Anexo III de la Directiva 98/81/CE y Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre:

Las operaciones relacionadas con la obtención, caracterización e hiperatenuación del nuevo OMG se clasifican como de Actividad Tipo 3 (actividad de alto riesgo en la que el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente).

III. INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO RECEPTOR O PARENTAL DEL CUAL SE DERIVA EL OMG

1) Nombre científico: fragmentos de RNA del virus asociado al síndrome agudo respiratorio severo (SARS)

Taxonomía: RNA de un miembro de la familia *Coronaviridae*

Nombre común: RNA del virus asociado a SARS-CoV.

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

Los distintos replicones se han construido a partir del cDNA que codifica el virus completo ensamblado en un BAC, mediante delección de distintos genes no esenciales y de genes semiesenciales. Los virus SARS-CoV-deleccionados crecen entre 10 y 100 veces menos en cultivos celulares, por lo que estarán altamente atenuados. Además se excluirán genes semiesenciales como el gen E que lo atenuan. El replicón se ensambló en un cromosoma artificial de bacterias (BAC).

Hay que tener en cuenta que el BAC con el que se va a trabajar va a tener deleccionados distintas combinaciones de genes semiesenciales y no esenciales, de tal forma que el replicón resultante estará altamente atenuado.



b) Técnicas de identificación:

Los distintos replicones se identificarán mediante el análisis por RT-PCR con oligonucleótidos específicos de los distintos genes.

c) Marcadores genéticos:

Se han introducido dos marcadores genéticos en el gen de la replicasa mediante la introducción de dos mutaciones silenciosas en este gen.

d) Marcadores fenotípicos:

Ninguno.

e) Estabilidad genética:

La estabilidad genética del cromosoma artificial de bacterias (BAC) que se va a utilizar es alta.

La estabilidad genética del replicón clonado en un cromosoma artificial de bacterias es alta en las bacterias *E. coli* en las que se ha generado. Permanece estable durante al menos 200 generaciones.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Ninguna

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor o parental?

SI NO

Los fragmentos de RNA del genoma del virus SARS-CoV en sí mismos no son patogénicos para ninguna especie.

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:

No aplica

5) Si el organismo receptor o parental 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.):

No aplica

a) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?



No aplica.

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

No aplica.

SI NO

Porqué: No aplica

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

Sí.

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

Se tiene una experiencia de 2º años en el manejo de fragmentos de RNA de otros coronavirus, como el coronavirus porcino TGEV.

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?:

Los fragmentos de RNA del virus SARS-CoV no pueden vivir fuera de las condiciones de cultivo.

El cromosoma artificial de bacterias (BAC) que codifica para los replicones no es capaz de sobrevivir fuera de las bacterias.

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

- | | | |
|-------|---------------------------------|--------------------------|
| i) | esporas | <input type="checkbox"/> |
| ii) | endosporas | <input type="checkbox"/> |
| iii) | quistes | <input type="checkbox"/> |
| iv) | esclerocios | <input type="checkbox"/> |
| v) | esporas asexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |
| vi) | esporas sexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |
| vii) | virus | <input type="checkbox"/> |
| viii) | Otros, especifíquese: No aplica | |

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:



El cromosoma artificial de bacterias es incapaz de multiplicarse fuera de la bacteria que se ha transformado con el mismo. Los fragmentos de RNA del virus no sobreviven en ningunas condiciones.

d) Posibles nichos ecológicos:

El cromosoma artificial de bacterias no se encuentra en la naturaleza, solo está en el laboratorio dentro de las bacterias del género *E. coli*.

En caso de escape del laboratorio de los replicones de SARS-CoV recombinantes no tendrían ningún nicho ecológico ya que son defectivos y no se pueden propagar.

f) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No existen en ecosistemas naturales.

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

Los fragmentos de RNA y el plásmido que se van a utilizar no se encuentran en el medio ambiente, solo están en las bacterias que se han transformado con él en el laboratorio. Respecto al replicón que codifica el BAC se ha construido en el laboratorio y no se encuentra en el medio ambiente.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Los fragmentos de RNA y el cromosoma artificial de bacterias no interaccionan con otros organismos.

Respecto a los replicones que codifica dicho plásmido no se han descrito interacciones con otros organismos ya que solo se encontrará en el laboratorio.

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

Los replicones codificados por el BAC con los que se va a trabajar no se encuentran en la naturaleza ya que han sido generados en el laboratorio. Los fragmentos de RNA del genoma del virus SARS-CoV tampoco.

12) Hábitat natural del organismo:

Ninguno.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: fragmentos de RNA del SARS-CoV



Taxonomía: Familia *Coronaviridae*

Nombre común: fragmentos de RNA del coronavirus humano asociado al síndrome agudo respiratorio severo.

2) Tipo de material genético utilizado para la transformación:

cDNA (DNA complementario) del genoma de SARS-CoV, cepa Urbani obtenido por RT-PCR.

3) Función prevista del material genético utilizado en la modificación genética:

La función de los productos génicos de estos genes se ha especificado en el apartado correspondiente del organismo receptor.

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

SI NO

Se va a trabajar con DNAs complementarios a los genes estructurales de SARS-CoV. Estos cDNAs y los productos génicos en ellos codificados no son patógenos. El virus completo del que derivan todos los genes sí es patógeno para seres humanos.

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

- i) seres humanos
- ii) animales
- iii) plantas

b) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?:

El virus SARS-CoV causa el síndrome respiratorio agudo severo en humano descrito ampliamente durante el año 2003.

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

No.

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

No.



V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

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

2) Finalidad de la modificación genética:

Construcción segura de replicones o replicones encapsidados (pseudoviriones) altamente atenuados basados en el coronavirus SARS-CoV con objeto de utilizarlos en el estudio de las bases moleculares de la replicación de SARS-CoV y como herramienta para el estudio de antivirales y vacunas.

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

Clonaje de los cDNAs que codifican distintas combinaciones de genes en un cromosoma artificial de bacterias para obtener distintos replicones. Los distintos cDNAs se generan por RT-PCR a partir de fragmentos de RNA viral.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

El vector utilizado es un cromosoma artificial de bacterias.

b) Dimensiones del vector (pares de bases):

7000 nucleótidos

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):

d) Gama de hospedadores del vector:

Bacterias

e) Características de la movilidad del vector:



- i) factores de movilización: No tiene
- ii) Si el vector es un bacteriófago, un cósmido o un fásmid, ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas? No aplica.
- iii) ¿Puede transferir el vector marcadores de resistencia a otros organismos? Podría, pero no se ha visto a lo largo de 5 años que se lleva trabajando con este vector. El vector no se integra en el cromosoma de la célula huésped que se transfecta por lo que es muy difícil que se transfiera ningún marcador.

5) Información del inserto:

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

El inserto que se va a introducir en el cromosoma artificial de bacterias para generar los replicones son genes del coronavirus SARS-CoV.

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

- c) Descripción del método utilizado para la transformación:

El BAC que codifica los distintos replicones que se utiliza para la transformación se introduce en células acomplejado con lípidos.

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

Indicada en el apartado relativo al organismo receptor.

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

Los insertos contienen los elementos reguladores de los distintos genes de SARS-CoV.

- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí.

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

No.

- h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.

No.

VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE



1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?

No. El MMG final son los distintos replicones y pseudoviriones defectivos.

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

No aplica.

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

No aplica

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?

No

En caso afirmativo:

i) número de copias: No aplica.

ii) localización cromosómica: No aplica.

iii) secuencias laterales: No aplica.

iv) ¿La inserción inactiva la expresión de otros genes?: No aplica.

c) Si se trata de un virus:

- i) Es defectivo
- ii) Es potencialmente inducible

El virus modificado genéticamente tendrá el gen E delecionado, que es un gen estructural, por lo que el virus rescatado está altamente atenuado, según se ha demostrado en hamsters.

Análisis moleculares realizados relativos a la expresión del producto deseado (PCR, Northern, secuenciación, otros):

- i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)
- ii) Transcripcionales (síntesis de niveles de mRNA)
- iii) Traduccionales (síntesis de niveles de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto.

2) Características genéticas y fenotípicas modificadas del organismo receptor o parental 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:

Ni los fragmentos de RNA ni los distintos replicones y pseudoviriones son capaces de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo.

- 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 los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:

No.

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

No

- e) Marcadores específicos del OMG:

El OMG tendrá genes no esenciales, como el 6, 7a, 7b, 8a y 8b, y semiesenciales, como el gen E.

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

La estabilidad genética de los distintos replicones en las células en las que se transfectan es alta.

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

Los replicones generados no transferirán material genético a otros organismos.

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

Los replicones generados no son patógenos para ninguna especie.

- 6) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.

- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.

Las técnicas que se utilizarán para la identificación de OMG serán:
Microscopía de fluorescencia mediante anticuerpos específicos de diferentes proteínas del virus SARS-CoV.



RT-PCR empleando oligonucleótidos complementarios de la secuencia de distintos genes del virus SARS-CoV.

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

El OMG no va a estar en el medio ambiente.

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

- | | | |
|------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| a) Enseñanza | <input type="checkbox"/> | Volumen máximo: |
| b) Investigación | <input checked="" type="checkbox"/> | Volumen máximo: 250 ml por ensayo |
| c) Desarrollo | <input type="checkbox"/> | Volumen máximo: |

2) Periodo propuesto para la utilización confinada:

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

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

Construcción segura de replicones o replicones encapsidados (pseudoviriones) altamente atenuados basados en el coronavirus SARS-CoV con objeto de utilizarlos en el estudio de las bases moleculares de la replicación de SARS-CoV y como herramienta para el estudio de antivirales y vacunas. Se espera generar moléculas que se replican pero que no se pueden propagar, por lo que son altamente seguras.

4) Descripción de los métodos de manejo de los OMG (incluyendo descripción de las fases de cultivo y concentración máxima de OMG en el cultivo):

En ningún caso se manejará el virus SARS-CoV como tal, se manejarán fragmentos de cDNA que codifican para el mismo obtenidos a partir de RNAs virales. Estos fragmentos de cDNA se clonarán en BACs.

5) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse incluida la información relativa a la gestión de los residuos (tratamiento, forma y destino final):

Todos los residuos biológicos que se generen serán inmediatamente inactivados dentro de los recintos de contención (cabinas de bioseguridad) mediante la utilización de germicidas de amplio espectro usados en rotación. Posteriormente, los residuos líquidos ya inactivados se enviarán a la planta de tratamiento de efluentes líquidos del laboratorio y los sólidos se autoclavarán. Los procedimientos de autoclavado y esterilización por calor en la planta "Biowaste" se han validado previamente y se validarán periódicamente mediante la utilización de kits de esporas del microorganismo testigo *Bacillus*



stearotherophilus. Estas validaciones se han realizado a nivel interno (servicio de bioseguridad del CNB) y a nivel externo (empresas especializadas en validaciones de estos sistemas). Para mayor información remitirse a la solicitud de autorización de la instalación.

5) Resultados previstos:

Se prevé obtener replicones defectivos que no se podrán propagar en cultivos celulares.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

-El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

-Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Seguridad Biológica validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

-La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de seguridad biológica. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.

-La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.

-Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma "in situ" y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.



-El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.

-El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.

-No existen zonas residenciales cercanas al CNB.

-No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

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

Las operaciones indicadas se realizarán en uno de los tres sublaboratorios del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica con autorización del 7/03/01; número de notificación: A/ES/00/I-8

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas a seguir serán las expuestas en el reglamento de funcionamiento del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica incluido en la solicitud de autorización.

2) Formación del personal adscrito:

El personal adscrito ha recibido la formación e información indicada en “Descripción de la información suministrada a los trabajadores”, apartado que se adjuntó a la documentación para la solicitud de autorización del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica.

Todo el personal implicado tiene experiencia en la manipulación de los agentes biológicos que se indican en esta solicitud y su formación académica es licenciatura o doctorado.



3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Viene descrito en el apartado 6.F del reglamento de funcionamiento de la instalación que se incluyó en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

Vienen descritos en los apartados 6.B, 6.C, 6.D y 6.G. del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Vienen descritos en el apartado 6.D. del Reglamento de funcionamiento de la instalación y más específicamente en “Procedimientos y planes de comprobación de la eficacia permanente de las medidas de confinamiento”.

Esta información se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio

Además el servicio de seguridad biológica velará por el cumplimiento de las normas de control de acceso, manipulación, descontaminación, esterilización, sanitización, etc. según se indica en diferentes apartados del citado Reglamento.

6) Gestión de residuos (describir el sistema utilizado para cada tipo de residuo y quien lo lleva a cabo):

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

7) Inactivación de residuos (método, forma final, destino):

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

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES (Cumplimentar para los tipos 2, 3 y 4)

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

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

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):



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

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

- Documentación:
 - Manual de Protección Radiológica, Seguridad Biológica y Química del CNB.
 - Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.
 - Procedimientos Normalizados de Trabajo del Servicio de Seguridad Biológica del CNB.
- Cursos y seminarios:
 - Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Protección Radiológica y Seguridad Biológica del CNB.
 - Seminarios específicos sobre el Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.

4) Planes de emergencia:

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



**EVALUACIÓN DE RIESGO DE OPERACIONES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE (Ver NOTA (1))**

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
-----------------	---------------------

A. Notificador

1. Nombre del Centro, Institución o Empresa:

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

2. Domicilio del notificador:

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).
Campus Universidad Autónoma. Cantoblanco.
28049-Madrid

3. Responsable de la actividad de utilización confinada:

Dr. Luis Enjuanes Sánchez
Profesor de Investigación (CSIC)

Firma del notificador:

Persona de contacto:

Fernando Usera Mena, responsable del Servicio de Protección Radiológica y Seguridad
Biológica del CNB

Tel: 915854541

Fax: 915854506

Correo electrónico: fusera@cnb.uam.es



B. Descripción de la actividad.

1. Objetivo de la actividad:

Construcción segura de replicones o replicones encapsidados (pseudoviriones) altamente atenuados basados en el coronavirus SARS-CoV con objeto de utilizarlos en el estudio de las bases moleculares de la replicación de SARS-CoV y como herramienta para el estudio de antivirales y vacunas.

2. Duración de la actividad:

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



C. Evaluación de riesgo (Ver NOTA (2))

1. Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del: (Ver NOTA (3))

1.1. Organismo receptor.

El organismo receptor son fragmentos de RNA del virus SARS-CoV.

- Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, alergenicidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades:
Los fragmentos de RNA no son patogénicos, virulentos, infecciosos, alergénicos, tóxicos, ni son vectores de transmisión de enfermedades.
- Naturaleza de los vectores autóctonos y los agentes adventicios en los casos en que puedan movilizar el material genético insertado, y frecuencia de movilización:
No aplica
- Naturaleza y estabilidad de las mutaciones inactivadoras, si se producen:
Los fragmentos de RNA no tienen ninguna mutación inactivadora.
- Toda modificación genética previa:
No existen modificaciones genéticas previas.
- Gama de hospedadores (si procede):
No procede
- Todo rasgo fisiológico significativo que pueda alterarse en el MMG final y, si procede, su estabilidad:
Ninguno.
- Hábitat natural y distribución geográfica:
No procede para los fragmentos de RNA. El habitat natural del virus SARS-CoV silvestre, sin modificaciones, son los seres humanos
- Participación significativa en procesos ambientales (Fijación del nitrógeno, regulación del pH., etc):
No procede. Los fragmentos de RNA no se encuentran en el medio ambiente.
- Interacción con otros organismos del entorno y efectos sobre éstos (incluyendo las probables propiedades competitivas, patogénicas o simbióticas):
No procede. Los fragmentos de RNA no se encuentran en el medio ambiente.
- Capacidad de formar estructuras de supervivencia (como esporas o esclerocios):
No procede

1.2. Organismo donante.

Fragmentos de RNA del coronavirus humano SARS-CoV, cepa Urbani. El virus del que proceden los fragmentos de RNA proviene de pacientes, en los que causa un síndrome respiratorio agudo severo, pero en ningún caso se manejará el virus completo.



- Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades:
El SARS-CoV es un patógeno humano que causa el síndrome respiratorio agudo severo. No se ha descrito que pueda infectar a plantas, ni otras especies animales. Este virus se ha clasificado como perteneciente al Grupo 3 de riesgo.
Respecto a la virulencia, se han descrito casos en pacientes de todas las edades, lo que parece indicar que esta cepa es bastante virulenta. La tasa de mortalidad se estima en torno al 4%.
No se conocen efectos alérgicos y tóxicos.
No se han descrito vectores que transmitan la enfermedad tales como artrópodos.
- Naturaleza de los vectores autóctonos:
 - ✓ Secuencia: No aplica
 - ✓ Frecuencia de movilización y especificidad: No aplica
 - ✓ Presencia de genes que confieren resistencia a las sustancias antimicrobianas, incluidos los antibióticos: No aplica
- Gama de hospedadores: especie humana, en la que infecta el tracto respiratorio y entérico.
- Otros rasgos fisiológicos pertinentes: Ninguno

1.3. Inserto.

- Identidad y función específicas del inserto (genes):
El inserto que se pretende introducir en el cromosoma artificial de bacterias corresponde a distintos genes de SARS-CoV.
- Nivel de expresión del material genético insertado:
Los genes se van a introducir bajo la secuencias reguladoras de la transcripción de cada gen por lo que el nivel de expresión de dichos genes será el mismo que el de los genes en una infección viral con el virus silvestre.
- Fuente del material genético e identidad del organismo u organismos donantes y características, si procede:
El organismo donante es la cepa Urbani del coronavirus SARS-CoV.
- Historia de las modificaciones genéticas previas, si procede:
No procede.
- Situación del material genético insertado (posibilidad de activación o desactivación de los genes del hospedador debido a la inserción):
Los genes de SARS-CoV que se introducen en el replicón producen regulación positiva y negativa de algunos genes del hospedador. ("Comparative host gene transcription by microarray analysis early after infection of the Huh-7 cell line by SARS-CoV and HCoV-229E". Tang et al. Journal of Virology. Vol. 79).



1.4. Vector.

Las secuencias que codifican los distintos replicones se han introducido en un cromosoma artificial de bacterias (BAC).

- Naturaleza y fuente del vector: plásmido derivado de un cromosoma artificial de bacterias.
- Estructura y cantidad de todo ácido nucleico del vector y/o donante que quede en la construcción final del microorganismo modificado: No aplica
- Si está presente en el MMG final, frecuencia de movilización del vector insertado y/o capacidad de transferencia de material genético: No aplica

1.5. Organismo modificado genéticamente resultante.

1.5.1. Efectos para la salud humana.

- Efectos tóxicos o alergénicos previstos del MMG y/o sus productos metabólicos:
El organismo modificado genéticamente no se preve que tenga efectos tóxicos o alergénicos sobre el hospedador, ya que el organismo resultante será un replicón o pseudoviriones defectivos.
- Comparación de la patogenicidad del microorganismo modificado con la del receptor o (en su caso) del organismo parental:
Los replicones resultantes y los fragmentos de RNA de los que derivan no son patogénicos.
- Capacidad de colonización prevista:
Los replicones no tienen capacidad de colonización.
- Si el microorganismo es patógeno para personas inmunocompetentes:
Los replicones y pseudoviriones no se preve que sean patógenos
- Enfermedades causadas y mecanismos de transmisión, incluidas la capacidad de invasión y la virulencia:
 - ✓ Dosis infecciosa: No aplica
 - ✓ Posible alteración de la ruta de infección o de la especificidad tisular: ninguna
 - ✓ Posibilidad de supervivencia fuera del hospedador humano: Ninguna
 - ✓ Estabilidad biológica: No aplica
 - ✓ Pautas de resistencia a los antibióticos: No aplica
 - ✓ Alergenicidad: No es alergénico



- ✓ Toxigenicidad: No es tóxico
- ✓ Disponibilidad de terapias apropiadas y de medidas profilácticas: No aplica

1.5.2. Efectos para el medio ambiente.

- Ecosistemas a los que el microorganismo podría pasar accidentalmente a partir de la utilización confinada:
Ninguno
- Supervivencia, multiplicación y grado de diseminación previstos para el microorganismo modificado en los ecosistemas correspondientes:
Los replicones no se encontrarán en ningún caso en el medio ambiente.
- Resultados previstos para la interacción entre el microorganismo modificado y los organismos o microorganismos que pudieran verse expuestos en caso de liberación accidental al entorno:
Ningún organismo se vería afectado en caso de escape accidental ya que los replicones no se pueden propagar ni en cultivos celulares ni en los organismos.
- Efectos conocidos o previstos sobre plantas y animales como, por ejemplo, patogenicidad, toxicidad, alergenidad, vector de patógenos, pautas alteradas de resistencia a los antibióticos, alteraciones de tropismos o especificidad de hospedador, y colonización:
No se preve ningún efecto ya que los replicones no se pueden propagar. Tampoco se esperan casos de toxicidad y alergenidad en los mismos.
- Implicaciones conocidas o previstas en procesos biogeoquímicos:
No se preven

2. Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente: (Ver NOTA (4))

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

Se clasifican como de Actividad Tipo 3 (actividad de alto riesgo en la que el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente) las operaciones relacionadas con la obtención, caracterización e hiperatenuación del nuevo OMG. Una vez se haya comprobado la atenuación por delección de genes esenciales y no esenciales, la actividad puede clasificarse como Tipo 2 (actividad de bajo riesgo en la que el grado 2 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente).

3. Probabilidad de que se produzcan efectos nocivos y gravedad de los mismos, en función de: (Ver NOTA (5))



3.1. Características de la actividad (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental).

La actividad se va a llevar a cabo en los laboratorios de seguridad biológica de nivel 3, por lo que el organismo modificado estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo.

3.2. Concentración y escala utilizadas.

Las transfecciones de los plásmidos que codifican los replicones se realizarán sobre células 293 T humanas o BHK de hamster, ya que estas células se transfectan con una alta eficiencia. El volumen máximo de células utilizado en cada ensayo será como máximo de 10 frascos de 25 cm² que se corresponden con 50 ml de sobrenadante.

3.3. 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).

Los experimentos de transfección de los plásmidos que codifican los distintos replicones se realizarán sobre células. Los experimentos se realizarán en los laboratorios de contención biológica de nivel 3, por lo que el personal y el entorno expuestos se reducen al máximo.

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

Actividad confinada de Tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente. El hecho de indicar que se podría trabajar en nivel 3 va a dirigido a trabajar en un entorno en el que no circulen coronavirus para alejar la posibilidad de una posible recombinación que diera lugar al rescate de un virus competente en propagación.

5. Determinación del riesgo en el caso de que se produzca una liberación accidental: (Ver NOTA (6))

5.1. Información adicional relativa a la ubicación de la instalación (proximidad a fuentes de peligro potenciales, condiciones climáticas predominantes, etc.)

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al Centro Nacional de Biotecnología es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

-El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.



-Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Seguridad Biológica validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

-La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de seguridad biológica. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.

-La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.

-Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma "in situ" y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.

-El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.

-El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.

-No existen zonas residenciales cercanas al CNB.

-No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

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

Las operaciones indicadas se realizarán en uno de los tres sublaboratorios del laboratorio de cultivos "in vitro" de nivel 3 de contención biológica con autorización del 7/03/01; número de notificación: A/ES/00/I-8



5.2. Condiciones en las que podría producirse un accidente.

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

5.3. Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.

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

5.4. Planes de emergencia.

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



NOTAS al Modelo de Evaluación de riesgo de operaciones de utilización confinada de organismos modificados genéticamente

- (1) Para la elaboración de la evaluación de riesgo de la actividad propuesta se tendrá en cuenta toda la información suministrada, en su caso, en el formulario relativo a la Notificación de Operaciones con organismo modificados genéticamente (Parte A), así como el relativo a la Notificación de Instalaciones donde se realizan operaciones con organismos modificados genéticamente (Parte B).
- (2) Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en el Anexo III de la Directiva 98/81/CE, de 26 de octubre de 1998 y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo descrita en el Anexo III de la Directiva 98/81/CE.
- (3) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.
- (4) Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 5.3 de la Directiva 98/81/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).
- (5) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.
- (6) Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.