



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

Nº de Registro:	Nº de Notificación: A/ES/08/10
------------------------	--

I. INFORMACIÓN GENERAL

A. Notificador

- 1) Nombre y titulación del responsable de la notificación:

Prof. Juan Carlos Lacal Sanjuán
Profesor de Investigación (CSIC).

- 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:

Prof. Juan Carlos Lacal Sanjuán, jefe del laboratorio 35 del CNB
Profesor de investigación del CSIC

- 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 un virus recombinante defectivo basado en el Moloney Murine Leucemia Virus (MoMuLV) que infecta células humanas con objeto de utilizarlo para transfectar oncogenes en líneas celulares humanas y estudiar su comportamiento.

- 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:

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 esta solicitud.

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

- 1) Nombre científico: Vector de expresión retroviral. Variante del Moloney Murine Leucemia Virus (MoMuLV)

Taxonomía: Retroviridae; subfamilia oncoviridae tipo C.

Nombre común: Retrovirus

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

Técnicas de aislamiento:

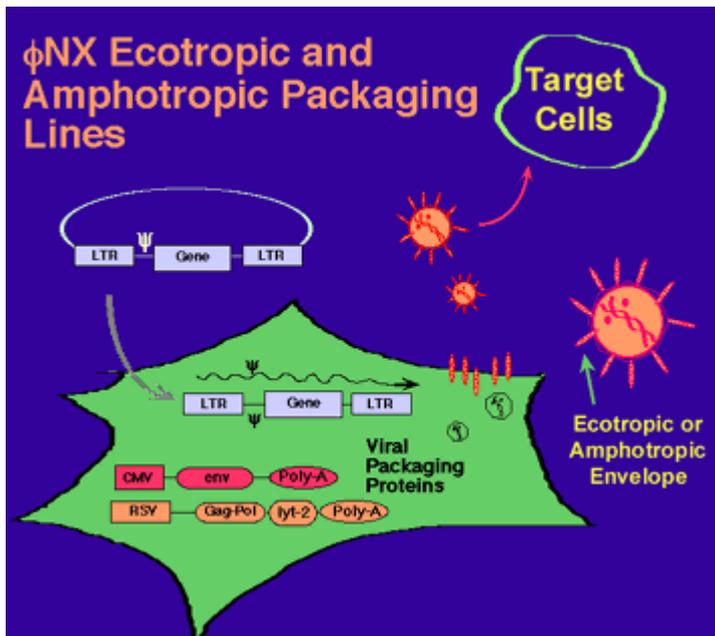
La información genética de la cepa de retrovirus a utilizar está dividida en tres partes a fin de dificultar al máximo que el virus se reconstituya de manera espontánea dentro de la célula que se quiere infectar. Serían necesarias tres recombinaciones para regenerar el virus completo lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad.

El vector retroviral, por tanto, proporciona las secuencias de regulación y empaquetamiento del virus (psi), mientras que la célula empaquetadora expresa las restantes proteínas necesarias para producir partículas víricas infectivas: polimerasa, integrasa (codificadas por el gen pol), proteínas de la cápside (codificadas por el gen gag) y proteínas de la envuelta del virus que conferirá el tropismo viral deseado, en este caso humano (codificadas por el gen env).

En nuestro caso utilizaremos como vector retroviral: pBABEpuro (Addgene). Como célula empaquetadora se utilizará una estirpe celular derivada de Hek293T (Phoenix-ampho Orbigen. RVC-10001).



Destacamos de nuevo que esta célula empaquetadora es capaz de producir virus porque tiene previamente transfectados en vectores de expresión los genes pol, gag y env. Los retrovirus producidos por esta célula empaquetadora pueden infectar a células de mamífero pero en ellas el virus no puede multiplicarse ya que esta célula infectada carece de los genes pol, gag y env que son necesarios para que el virus sea ensamblado.



Técnicas de identificación:

Las células empaquetadoras se adquirirán de Orbigen (Phoenix Ampho. Nº de catálogo: RVC-10001 (www.orbigen.com)).

El plásmido retroviral pBABE se comprará a Addgene. Este plásmido se chequeará cortando con enzimas de restricción. Ver mapa en ANEXO 1.

Marcadores genéticos:

pBABE-puro:

pBABE 5' CTTTATCCAGCCCTCAC 3'

Primer para secuenciar el plásmido. Ver secuencia en ANEXO1.

Marcadores fenotípicos:

pBABE-puro: selección bacteriana con Ampicilina y selección en células de mamífero con Puromicina.



Estabilidad genética:

La estabilidad genética tanto de la célula empaquetadora comercial como del plásmido retroviral que se va a utilizar es alta.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Todas aquellas necesarias para crear el sistema:

- Generación de un vector retroviral que contiene las secuencias de regulación y empaquetamiento del virus (psi),
- Transfección en una célula HEK-29 de vectores de expresión que contienen las restantes proteínas necesarias para producir partículas víricas infectivas: polimerasa, integrasa (codificadas por el gen pol), proteínas de la cápside (codificadas por el gen gag) y proteínas de la envuelta (codificadas por el gen env).

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

SI NO

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.):

Al no ser patógeno se debe considerar perteneciente al Grupo de Riesgo 1, sin embargo en el CNB todos los vectores retrovirales se asignan al Grupo de Riesgo 2.

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?

SI NO

Porqué: Porque las modificaciones generadas para desarrollar los virus hacen que la regeneración del virus original sea prácticamente imposible.



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

Si

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

Experiencia general en técnicas de Biología Molecular y Celular. Además se tiene una experiencia de 20 años en el manejo de fragmentos de DNA con capacidad oncogénica.

- 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?:

Ni el plásmido retroviral ni las células empaquetadoras son capaces de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo.

Respecto al virus, hay que resaltar que es un virus recombinante defectivo, no se encuentra en el medio ambiente y en el caso de que saliera del laboratorio e infectara un organismo, el virus no sería patógeno por estar altamente atenuado.

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 plásmido retroviral es un fragmento de ADN sin vida propia. No pueden por tanto sobrevivir en ningún sistema. Las células empaquetadoras tampoco pueden vivir fuera de las condiciones de cultivo del laboratorio.

El virus creado en la célula empaquetadora se inactiva, además de por la radiación solar, por agentes químicos como detergentes, hipoclorito, etc.

La capacidad de supervivencia del retrovirus en el medio ambiente esta muy limitada ya que al tratarse de un virus defectivo no se puede propagar en los organismos huésped.

- d) Posibles nichos ecológicos:

El plásmido retroviral es un fragmento de ADN sin vida propia.



Las células empaquetadoras no sobreviven fuera de las condiciones de cultivo. En caso de escape del laboratorio del retrovirus recombinante defectivo, la cantidad sería mínima, ya que se trabaja a muy baja concentración, por lo que sería muy difícil que el virus se propagara e infectara a ningún organismo. Además de que la capacidad de supervivencia del retrovirus en el medio ambiente esta muy limitada ya que al tratarse de un virus defectivo no se puede propagar en los organismos huésped.

Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

Ni el plásmido ni las células empaquetadoras que se va a utilizar se encuentran en el medio ambiente, y es completamente improbable su salida del laboratorio. Lo mismo ocurre con los virus que se generan: no saldrán del laboratorio, además de ser defectivos por lo que no se esperan efectos en el medio ambiente.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Ni el plásmido ni las células empaquetadoras que se va a utilizar se encuentran en el medio ambiente, y es completamente improbable su salida del laboratorio. Lo mismo ocurre con los virus que se generan: no saldrán del laboratorio, además de ser defectivos por lo que no se esperan interacciones con otros organismos.

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

No aplica

12) Hábitat natural del organismo:

No aplica

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: DNA de Homo Sapiens

Taxonomía: Familia *Hominidos*

Nombre común: Hombre



2) Tipo de material genético utilizado para la transformación:

cDNA (DNA complementario) al genoma de Homo Sapiens correspondiente a los siguientes genes:

- Colina quinasa alfa wt
- Colina quinasa beta wt
- RhoAwt
- Rac1wt
- Cdc42wt
- Rnd1wt
- Rnd2wt
- Rnd3wt

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

La función de las proteínas codificadas por estos genes es la que queremos determinar en nuestros experimentos. Estudios previos han mostrado que pueden estar implicadas en el desarrollo tumorigénico o de proliferación celular.

4) ¿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

No aplica.

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

No aplica

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

No aplica

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:

Generar un retrovirus (previamente altamente atenuado *in vivo*) que nos ayude posteriormente a transducir células de mamífero con los genes en estudio.

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

Se subclonarán los genes de interés en los vectores retrovirales pBABE, que llevan ya la secuencia de iniciación del empaquetamiento.

A continuación estos vectores retrovirales se transfectarán en las células empaquetadoras Phoenix por el método del fosfato cálcico y estas células secretarán virus con la secuencia del gen de interés en su interior pero sin el resto de secuencias necesarias para ensamblar nuevos viriones.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

Vector retroviral **pBABE-puro**

Para más información:

Ver **ANEXO 1** o

<http://www.addgene.org/pgvec1?f=c&cmd=findpl&identifier=1764>

b) Dimensiones del vector (pares de bases):

5169 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):

Ver **ANEXO 1**.

- d) 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?

El vector no se integra en el cromosoma de las células de mamífero que se transfectan, por lo que aunque tiene marcadores de resistencia, estos no se transmiten.

- 5) Información del inserto:

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

La secuencia de los cDNA de los genes que se van a introducir se adjunta en el **ANEXO 2**.

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

El origen de los genes es el genoma humano. Los cromosomas correspondientes se adjuntan en el **ANEXO 2**.

Los insertos no están divididos en partes, son una secuencia única que codifica para una proteína humana.

- c) Descripción del método utilizado para la transformación:

La **clonación molecular** se refiere al proceso de aislar una secuencia de ADN de interés, insertarlo en un plásmido y obtener múltiples copias de ella en un organismo (generalmente procarionta) por acción de la DNA polimerasa. La clonación se emplea frecuentemente para amplificar fragmentos de ADN que contienen genes, un paso esencial en el análisis subsecuente.

La clonación de cualquier secuencia de ADN incluye los siguientes pasos:

Fragmentación: Inicialmente, el ADN de interés necesita ser fragmentado para proveer un segmento relevante de ADN de un buen tamaño. La preparación de los fragmentos para la clonación se obtiene frecuentemente del PCR, pero también puede hacerse por medio



de la digestión con enzimas de restricción y a veces fraccionando con electroforesis en gel.

Ligación: Un procedimiento de ligación se emplea cuando el fragmento amplificado se inserta en un vector. Dicho vector (que generalmente es circular) se convierte en una secuencia lineal utilizando enzimas de restricción, y es incubado con el fragmento de interés bajo las condiciones apropiadas con una enzima llamada ADN ligasa.

Transfección: Después de la ligación, el vector con el gen de interés se transfecta a las células empaquetadoras, en nuestro caso lo realizaremos con el método del fosfato cálcico. En el medio de cultivo de estas células empaquetadoras se encontrarán los viriones. Utilizaremos este sobrenadante para infectar posteriormente las células en estudio.

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 que se van a clonar en el vector retroviral (Colina quinasa alfa wt, colina quinasa beta wt, RhoAwt, Rac1wt, Cdc42wt, Rnd1wt, Rnd2wt y Rnd3wt) son secuencias de cDNA que codificarán posteriormente para las proteínas correspondientes, ninguno posee en su interior ningún elemento regulador.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí, las secuencias de los insertos se adjuntan en el **ANEXO 2**.

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?

En un principio si. Los genes obtenidos mediante PCR de material genético humano, son clonados en un vector retroviral (pBABE).

Una vez transfectado este vector en las células empaquetadoras, se formarán los viriones y este material genético se encontrará formando parte de una partícula virica, que infectará una sola vez, puesto que no lleva el resto de genes (gag, pol y env) necesarios para replicarse.

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

El número de copias de los genes en el vector retroviral es 1.

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

Si.

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.

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

c) Si se trata de un virus:

i) Es defectivo

ii) Es potencialmente inducible

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)

La expresión de los genes de interés se puede determinar en las células diana mediante Western Blot y PCR.



Aportar toda la documentación al respecto.

Ver secuencias de los genes en **ANEXO 2**.

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:

No. El virus defectivo generado es un virus defectivo, crece en las mismas condiciones de cultivo que el virus defectivo parental. Además, ninguno de los dos puede crecer 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. La información genética de la cepa de retrovirus a utilizar sigue dividida en tres partes en la célula empaquetadora a fin de dificultar completamente que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres recombinaciones para regenerar el virus completo lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad.

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

No, ya que ninguno de los dos se encuentra en el medio ambiente.

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

No

e) Marcadores específicos del OMG:

El OMG será un virus que contendrá en su material genético alguno de los siguientes genes:

- Colina quinasa alfa
- Colina quinasa beta
- RhoA wt
- Rac1 wt
- Cdc42 wt
- Rnd1 wt
- Rnd 2 wt
- Rnd3 wt



Sin embargo no poseerá en su genoma los genes gag, pol y env necesarios para su ensamblaje.

Además el virus defectivo llevará un gen de resistencia a puromicina.

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

El plásmido utilizado y las células empaquetadoras tienen una alta estabilidad genética. Los virus que se generan en la célula empaquetadora, infectarán la célula en estudio una sola vez y no se replicarán, por lo que no habrá ninguna generación más de este OMG. Son virus que se generaron todos de igual manera, (transfectando el plásmido, cuya estabilidad es absoluta) y estos virus no se replicarán.

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

El virus resultante infectará e integrará el gen (inserto) correspondiente en el genoma de las células en estudio de mamífero. La secuencia entre las regiones LTR. (Esta es la finalidad de esta técnica: que el gen de interés se inserte en el material genético de la célula infectada de manera estable y exprese la correspondiente proteína).



Pero estas células de mamífero no generan virus, porque el virus no es replicativo. Simplemente expresarán en mayor cantidad el gen en estudio (es una técnica ampliamente utilizada para expresar proteínas de forma estable en células de mamífero).

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

No. Tanto en el sistema parental como en el modificado por nosotros, la información genética de la cepa de retrovirus a utilizar está dividida en tres partes a fin de dificultar en el máximo grado que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres recombinaciones para regenerar el virus completo lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad.

- 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 a posteriori, es decir, en el sobrenadante de la célula empaquetadora se encontrarán los viriones, con este sobrenadante se infectarán células de mamífero, y en estas células se comprobará si se ha insertado el gen de interés. Por medio de dos técnicas principales:

- RT-PCR empleando oligonucleótidos que flanquean la secuencia de los genes introducidos, para identificar el gen introducido.



- Western blot: utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas a las que dan lugar los insertos (colina quinasa alfa wt, colina quinasa beta wt, RhoAwt, Rac1wt, Cdc42wt, Rnd1wt, Rnd2wt y Rnd3wt).

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

El OMG no puede sobrevivir 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: 500mL por ensayo |
| c) Desarrollo | <input type="checkbox"/> | Volumen máximo: |

2) Periodo propuesto para la utilización confinada:

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

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

Construcción segura de un vector retroviral defectivo basado en el Molone Murine Leucemia Virus (MoMuLV) que infecta células humanas con objeto de utilizarlo para transfectar oncogenes en líneas celulares humanas y estudiar su comportamiento.

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):

El transgén se introducirá mediante técnicas de CLONAJE entre las secuencias LTR virales de los vectores pBABEpuro (addgene #1764), no conteniendo genes estructurales virales funcionalmente activos.

1. Día1. Siembra de células Phoenix (empaquetadoras anfotrópicas).
2. Día2. Transfección por métodos de fosfato cálcico siguiendo las instrucciones de la casa comercial de los vectores retrovirales descritos, portando en cada caso una copia del transgén de interés.

Los volúmenes de células transfectadas serán de un máximo de 50 placas de 100mm de diámetro. (10ml de medio de cultivo por placa).

La transfección de estos vectores en las células Phoenix 293T, generará un sobrenadante que contendrá partículas infectivas defectivas capaces de transducir células



de mamífero. Con este sobrenadante se llevará a cabo la infección de líneas celulares de mamífero. El transgen en estudio se integrará en el genoma de dichas células de mamífero. Estas células de mamífero ya no son capaces de generar nuevas partículas virales.

Las líneas celulares que utilizaremos son: HMEC, SK-BR3, T47D, MBA-MD-231, MBA-MD-435, MBA-MD-468, DLD-1, SW620, HT29, HeLa, Kek-293.

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

- 5) Resultados previstos:

Se prevé obtener un retrovirus modificado, capaz de infectar células de mamíferos, pero defectivo, lo que implica que el virus no tiene capacidad infectiva.

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/ES/08/10
------------------------	---

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. Juan Carlos Lacal Sanjuan
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.

Objetivo de la actividad:

Construcción segura de un virus recombinante defectivo basado en el Molone Murine Leucemia Virus (MoMuLV) que infecta células humanas con objeto de utilizarlo para transfectar oncogenes en líneas celulares humanas y estudiar su comportamiento.

Duración de la actividad:

Se preve un periodo de tres 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 no existe en la naturaleza. Es un sistema utilizado en miles de laboratorios del mundo, para expresar de manera artificial proteínas en células de mamífero.

http://www.orbigen.com/commerce/catalog/product.jsp?product_id=2225

El sistema funciona de la siguiente manera:

La información genética de la cepa de un retrovirus está transfectada en el interior de unas células, llamadas **células empaquetadoras**, pero dividida en tres partes a fin de dificultar al máximo que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres recombinaciones para generar el virus completo lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad. Estas células empaquetadoras expresan las proteínas necesarias para producir partículas víricas infectivas: polimerasa, integrasa (codificadas por el gen pol), proteínas de la cápside (codificadas por el gen gag) y proteínas de la envuelta del virus que conferirá el tropismo viral deseado, en este caso humano (codificadas por el gen env).

Las células empaquetadoras se adquirirán de Orbigen (Phoenix Ampho. Nº de catálogo: RVC-10001) (www.orbigen.com).

Además se necesita un vector, también llamado plásmido retroviral, que va a proporcionar las secuencias de regulación y empaquetamiento del virus, y en el que se subclonará entre las secuencias LTR (long terminal repeat) el gen que deseamos se sobreexpresen en las células en estudio. (Vector retroviral pBABEpuro. Addgene).

Como célula empaquetadora se utilizará una estirpe celular derivada de la humana Hek293T. Cuando el plásmido retroviral se transfecte en las células empaquetadoras, secretarán virus al medio de cultivo, los cuales serán capaces de infectar a células de mamífero (pero sólo con el ADN contenido entre las secuencias LTR del plásmido retroviral). Una vez que ha infectado a la célula el virus no puede multiplicarse y la célula no puede generar más virus ya que esta célula infectada carece de los genes pol, gag y env que son necesarios para que el virus sea ensamblado e infectivo.

- Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, alergenicidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades:

Se trata de un vector viral defectivo no replicativo. La información genética de la cepa de un retrovirus está dividida en tres partes a fin de dificultar al máximo que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres recombinaciones para generar el virus completo lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad.



- 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:

La información genética de la cepa de un retrovirus está transfectada en el interior de unas **células empaquetadoras**, pero dividida en tres partes a fin de dificultar al máximo que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres recombinaciones para generar el virus completo lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad.

- Toda modificación genética previa:

Todas aquellas necesarias para crear el sistema:

- Generación de un vector retroviral que contiene las secuencias de regulación y empaquetamiento del virus (psi),
- Transfección en una célula HEK-29 de vectores de expresión que contienen las restantes proteínas necesarias para producir partículas víricas infectivas: polimerasa, integrasa (codificadas por el gen pol), proteínas de la cápside (codificadas por el gen gag) y proteínas de la envuelta (codificadas por el gen env).

- Gama de hospedadores (si procede):

Cualquier célula de mamífero puede ser infectada, pero una sola vez. El virus no es replicativo. Esto es así, porque el virus introduce únicamente el ADN contenido entre las secuencias LTR, el material genético de estos virus no contiene el resto de genes necesarios para producir nuevas partículas víricas infectivas: polimerasa, integrasa (codificadas por el gen pol), proteínas de la cápside (codificadas por el gen gag) y proteínas de la envuelta (codificadas por el gen env).

- Todo rasgo fisiológico significativo que pueda alterarse en el MMG final y, si procede, su estabilidad:

El OMG se considera estable.

- Hábitat natural y distribución geográfica:

Estos virus retrovirales no existen en la naturaleza y no son capaces de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo en el laboratorio.

- Participación significativa en procesos ambientales (Fijación del nitrógeno, regulación del pH., etc):

Estos virus retrovirales no existen en la naturaleza y no son capaces de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo en el laboratorio.



- Interacción con otros organismos del entorno y efectos sobre éstos (incluyendo las probables propiedades competitivas, patogénicas o simbióticas):

No aplica

- Capacidad de formar estructuras de supervivencia (como esporas o esclerocios):

No aplica

1.2. Organismo donante: Homo Sapiens Sapiens

El material genético que se va a introducir en el plásmido retroviral es ADN copia de genes humanos obtenido de células humanas.

- Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades:

No aplica

- 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: El vector retroviral lleva como marcador el gen de la resistencia a Puomicina que sí pasará junto con el gen de interés a las células infectadas.

- Gama de hospedadores: No aplica.

- Otros rasgos fisiológicos pertinentes: No aplica

1.3. Inserto.

▪ Identidad y función específicas del inserto (genes):
cDNA (DNA complementario) al genoma de Homo Sapiens correspondiente a los siguientes genes:

- Colina quinasa alfa wt
- Colina quinasa beta wt
- RhoAwt
- Rac1wt
- Cdc42wt
- Rnd1wt
- Rnd2 wt



- Rnd3wt
- Nivel de expresión del material genético insertado:
No aplica
- Fuente del material genético e identidad del organismo u organismos donantes y características, si procede:
El organismo donante es Homo Sapiens Sapiens.
- Historia de las modificaciones genéticas previas, si procede:
No se han descrito modificaciones genéticas previas.
- Situación del material genético insertado (posibilidad de activación o desactivación de los genes del hospedador debido a la inserción):
El genoma del virus defectivo, que contiene nuestro gen de interés se integrará en el genoma de las células diana de una manera estable (esta es la finalidad de la técnica), y consecuentemente expresará la proteína de interés.
En caso de accidente e inoculación del virus en el investigador, el gen se introduciría en el genoma (si se diesen condiciones idóneas) en una sola célula y no sería capaz de replicarse.

1.4. Vector.

- Naturaleza y fuente del vector:

Vector retroviral pBABE-puro de la casa comercial Addgene.

<http://www.addgene.org/pgvec1?f=c&cmd=findpl&identifier=1764>

- Estructura y cantidad de todo ácido nucleico del vector y/o donante que quede en la construcción final del microorganismo modificado.

El retrovirus llevará una copia de la siguiente construcción. No lleva los genes gag, pol y env y por ello es defectivo.



- Si está presente en el MMG final, frecuencia de movilización del vector insertado y/o capacidad de transferencia de material genético.

El vector no está presente en el virus final defectivo. Únicamente la secuencia que se encuentra entre las dos secuencias LTR formaran parte del genoma viral.



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.

Aunque se trata de un virus que no se puede replicar, existe un riesgo: que los viriones entraran en contacto células del investigador como producto de una inoculación accidental, y pudieran producir una expresión elevada de los oncogenes en estudio.

- Comparación de la patogenicidad del microorganismo modificado con la del receptor o (en su caso) del organismo parental.

En ambos sistemas la información genética de la cepa de retrovirus está dividida en tres partes a fin de dificultar al máximo que el virus se reconstituya de manera espontánea, siendo necesarias tres recombinaciones para regenerar el virus completo lo que es altamente improbable y no se ha observado con anterioridad.

El OMG tiene el único riesgo de posible inoculación en células del investigador por pinchazo accidental y por tanto posible expresión elevada del oncogen en estudio en una sola célula del investigador. (El virus no infectará ninguna célula más, ya que es defectivo).

- Capacidad de colonización prevista.

Ninguna. El OMG generado es un virus que no puede crecer fuera de las condiciones de cultivo.

- Si el microorganismo es patógeno para personas inmunocompetentes:

No es patógeno.

- Enfermedades causadas y mecanismos de transmisión, incluidas la capacidad de invasión y la virulencia. No aplica.

✓ Dosis infecciosa: No aplica

✓ Posible alteración de la ruta de infección o de la especificidad tisular: No aplica.

✓ Posibilidad de supervivencia fuera del hospedador humano: El virus solo puede replicar dentro de las células empaquetadoras.

✓ Estabilidad biológica: No se conoce, pero se prevé que la estabilidad genética sea muy alta.



- Pautas de resistencia a los antibióticos: Si en caso de accidente, el investigador se inocula el virus, las células infectadas serán resistentes a puromicina.
- Alergenicidad: No se esperan reacciones alérgicas en caso de inoculación accidental.
- Toxigenicidad: No se esperan reacciones toxicológicas en caso de inoculación accidental.
- Disponibilidad de terapias apropiadas y de medidas profilácticas: En caso de infección accidental por el virus se procedería a un seguimiento y terapia adecuados a los resultados clínicos que se pudieran obtener.

1.5.2. Efectos para el medio ambiente.

- Ecosistemas a los que el microorganismo podría pasar accidentalmente a partir de la utilización confinada:
El OMG es incapaz de sobrevivir en el medio ambiente
- Supervivencia, multiplicación y grado de diseminación previstos para el microorganismo modificado en los ecosistemas correspondientes:
No aplica
- 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:
No aplica
- 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 aplica.
- Implicaciones conocidas o previstas en procesos biogeoquímicos:
No aplica

2. Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

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

Probabilidad de que se produzcan efectos nocivos y gravedad de los mismos, en función de:



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 el laboratorio de contención de nivel 3, por lo que el organismo modificado estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo. El riesgo de inoculación accidental del vector retroviral es prácticamente nulo debido a la ausencia de material punzante y cortante en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica y por contacto no hay riesgo de contagio.

3.2. Concentración y escala utilizadas.

Para rescatar el virus defectivo se utilizarán células empaquetadoras Phoenix en un volumen máximo de 20 frascos F75, que equivalen a 500 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).

El rescate de virus defectivos producidos se realizará en células Phoenix. Los experimentos se realizarán en el laboratorio de contención biológica de nivel 3, por lo que el personal y el entorno expuestos se reducen al máximo.

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

Actividad confinada de Tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

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

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

4) 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.

5) 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.

6) 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.