



**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 un virus recombinante defectivo basado en el coronavirus SARS-CoV que infecta células humanas con objeto de utilizarlo en investigación y como vector para vacunas y terapia génica.

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 la obtención, caracterización e hiperatenuación del nuevo OMG. Una vez se haya comprobado la hiperatenuación del OMG tras la delección del gen E, 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).

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, cepa Urbani

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

Los fragmentos de RNA del virus SARS-CoV se han identificado mediante secuenciación y provienen del CDC (Atlanta, EEUU), por lo que en ningún caso se manejará el virus infectivo.

Para la generación del virus defectivo se ha generado un cDNA que codifica el virus defectivo. Previamente, se ha generado un cDNA completo de SARS-CoV a partir de los fragmentos de RNA virales por RT-PCR. El cDNA completo del virus SARS-CoV se ha clonado en un cromosoma artificial de bacterias (BAC). El plásmido que codifica el cDNA completo de SARS-CoV se ha amplificado en bacterias y se ha utilizado para delecionar el gen E mediante técnicas de clonaje convencional.

El plásmido que codifica el virus SARS-CoV defectivo en el gen E se utilizará para rescatar virus defectivos mediante la transfección de este plásmido en células Vero E6, susceptibles a la infección. En ningún caso se rescatará el virus completo, el cDNA del



virus completo solo se ha construido como paso previo necesario a la generación del cDNA del virus defectivo. Hay que tener en cuenta que el BAC con el que se va a trabajar va a tener delecionado el gen E, que hace que el virus esté altamente atenuado *in vivo*, ya que está implicado en el ensamblaje, morfogénesis y salida del virus.

b) Técnicas de identificación:

El rSARS-CoV-ΔE se identificará mediante microscopía de fluorescencia y Western blot utilizando anticuerpos monoclonales específicos marcados. También se identificará por RT-PCR mediante oligonucleótidos específicos de distintas secuencias. Los fragmentos de RNA de SARS-CoV se han identificado mediante secuenciación.

c) Marcadores genéticos:

El marcador genético es la delección del gen E.

d) Marcadores fenotípicos:

El virus se tiene que rescatar en células susceptibles a la infección por SARS. Al tener un gen estructural delecionado, el virus replica con menor eficiencia, da títulos virales unas 20 veces menores en células Vero E6. Los títulos máximos alcanzados por el virus parental son de alrededor de 10^7 unidades formadoras de placa (pfu) por ml, mientras que el título del virus defectivo máximo está en torno a $5 \cdot 10^5$ pfu/ml. Las placas de lisis que forma son menores comparadas con las del virus silvestre. La infección de células de riñón de mono verde africano, Vero E6, por el virus rescatado tras la transfección con dicho plásmido se prevé que induzca sincitios.

e) Estabilidad genética:

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

La estabilidad genética del cDNA correspondiente al virus defectivo clonado en el BAC en las bacterias *E. coli* en las que se ha generado se ha visto que también es alta, permanece estable durante al menos 200 generaciones.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Ninguna

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.):

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?

Las células de riñón de mono verde africano (Vero E6) en las que se rescata el virus defectivo a partir del cDNA podrían contener retrovirus endógenos.

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

Se tiene una experiencia de 20 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?:

El cromosoma artificial de bacterias (BAC) que codifica para el virus rSARS-CoV-ΔE no es capaz de sobrevivir fuera de las bacterias ni tampoco los fragmentos de RNA virales. Respecto al virus silvestre del que deriva el rSARS-CoV-ΔE, sí que es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo, es un virus que se transmite por el aire y sabemos que su infectividad se anula cuando es sometido a una temperatura de 60°C durante 30 minutos, y que se inactiva por la radiación solar. Sin embargo, hay que resaltar que el 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 cromosoma artificial de bacterias es incapaz de sobrevivir fuera de la bacteria que se ha transformado con el mismo. Los fragmentos de RNA no pueden sobrevivir en ningún sistema.

El virus codificado por el BAC además de por la radiación solar, se inactiva por agentes químicos como detergentes, hipoclorito, etc. La capacidad de supervivencia del rSARS-CoV- Δ E en el medio ambiente es similar a la del SARS-CoV, pero su virulencia es menor, además al tratarse de un virus defectivo no se puede propagar en los organismos huésped.

d) Posibles nichos ecológicos:

El cromosoma artificial de bacterias que codifica el virus SARS-CoV defectivo no se encuentra en la naturaleza, solo está en el laboratorio dentro de las bacterias del género *E. coli*. Los fragmentos de RNA utilizados para generar el plásmido tampoco se encuentran en la naturaleza.

En caso de escape del laboratorio el virus SARS-CoV 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.

f) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

Los fragmentos de RNA y el plásmido que codifica el virus SARS-CoV 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):

El plásmido que se va a utilizar no se encuentra en el medio ambiente, solo está en las bacterias que se han transformado con él en el laboratorio. Los fragmentos de RNA de SARS-CoV tampoco están en la naturaleza.

Respecto al virus que codifica se ha construido en el laboratorio y no se encuentra en el medio ambiente.



b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

El cromosoma artificial de bacterias no interactúa con otros organismos ya que está confinado a las bacterias que existen en el laboratorio y es poco probable que salga de él ya que es incapaz de propagarse.

Respecto al virus 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:

El virus recombinante codificado por el BAC con el que se va a trabajar no se encuentra en la naturaleza ya que ha sido generado en el laboratorio. Los fragmentos de RNA virales tampoco se encuentran en la naturaleza.

12) Hábitat natural del organismo:

El virus rescatado rSARS-CoV- Δ E no se encuentra en la naturaleza.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: RNA del SARS-CoV, cepa Urbani

Taxonomía: Familia *Coronaviridae*

Nombre común: Coronavirus humano asociado al síndrome agudo respiratorio severo.

2) Tipo de material genético utilizado para la transformación:

cDNA (DNA complementario) al genoma de SARS-CoV al que se le ha delecionado el gen E obtenido por RT-PCR a partir del RNA viral.

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 al genoma 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 humanos ampliamente descrito 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:

Generar un virus basado en SARS-CoV defectivo en el gen E para estudiar la función de dicho gen y generar un virus altamente atenuado *in vivo* aplicable en vacunas y terapia génica.

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

Generación de un BAC que codifica rSARS-CoV-ΔE.

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): Descritas en el artículo (1).

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? El vector no se integra en el cromosoma de las células Vero E6 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:

El inserto que se va a introducir en el cromosoma artificial de bacterias es la secuencia completa de cDNA complementaria al genoma de SARS-CoV con el gen E deletado. El mapa de restricción y la secuencia de estos insertos se adjuntan junto con el mapa de restricción y la secuencia de todo el virus.

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

El origen y función de los genes están detallados en el apartado correspondiente al organismo receptor.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:



Amplificación por PCR mediante un oligonucleótido que introduce la delección necesaria para eliminar la expresión del gen E.

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:

El inserto que codifica toda la secuencia de SARS-CoV defectivo lleva todos los elementos reguladores propios del virus.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí, la secuencia se adjunta así como la secuencia del virus completo.

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 organismo modificado genéticamente es el virus rescatado defectivo.

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:

Los fragmentos de RNA que se han utilizado para generar el OMG no son capaces de crecer fuera de las condiciones de cultivo. El OMG generado es un virus, no puede crecer fuera de las condiciones de cultivo pero sí que se podría mantener en el medio ambiente.

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

Los fragmentos de RNA de los que deriva el virus defectivo no se reproducen. El OMG podrá replicarse en cultivos celulares en menor nivel que el virus SARS-CoV completo, aunque este virus en ningún caso se rescatará.

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 tendrá el gen E deletado.

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

No se conoce, pero se prevé que la estabilidad genética del inserto sea alta, aunque podría sufrir algunas modificaciones puntuales en su secuencia en el proceso de replicación.

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

El virus resultante no se prevé que se integre en el cromosoma del huésped, por lo que no se transferirá material genético al mismo. El virus generado podría transferir material genético a otros virus que infectaran el organismo, pero no se prevé que esto tenga consecuencias significativas.

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

El OMG en teoría podría infectar el intestino delgado de humanos, pero como será defectivo en el gen esencial E en caso de que infectara, no causaría el síndrome agudo respiratorio severo, ya que está altamente atenuado. Los fragmentos de RNA virales en sí mismos no son patogénicos.

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 que flanquean la secuencia del gen E, para identificar la delección introducida.

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 un vector viral defectivo basado en el virus SARS-CoV que infecte células humanas del tracto respiratorio y entérico con objeto de utilizarlo en investigación. El objetivo principal es analizar la función del gen E y generar un virus altamente atenuado in vivo como posible candidato a vacuna y terapia génica.

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 manejará el cDNA que codifica para el mismo al que se le ha delecionado el gen E con el objeto de generar un vector defectivo altamente atenuado. Este BAC se utilizará para transfectar células Vero E6, esperándose así que se rescate el virus recombinante.

El rescate de los virus defectivos así como las modificaciones del cromosoma artificial de bacterias se realizarán en el laboratorio de contención biológica de nivel 3.

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 virus modificado, capaz de infectar el tracto respiratorio y entérico humano, pero defectivo, lo que implica que el virus está altamente atenuado, como se ha



demostrado en hamsters. Con ello, el vector viral se podrá utilizar para vacunación y para terapia génica.

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 (especificquese):

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.

REFERENCIAS

1. **Wang, K., C. Boysen, H. Shizuya, M. I. Simon, and L. Hood. 1997. Complete nucleotide sequence of two generations of a bacterial artificial chromosome cloning vector. *BioTechniques* 23:992-994.**



**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:

Se partirá de un cDNA que codifica el virus SARS-CoV al que le ha delecionado el gen E, que es un gen estructural, con el objetivo de analizar el papel del gen E en el ciclo viral de SARS- CoV y generar un virus altamente atenuado utilizable como vacuna y en terapia génica.

2. Duración de la actividad:

Se preve 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 es el RNA del virus SARS-CoV. El RNA se obtuvo del CDC (Atlanta, EEUU), por lo que en ningún caso se maneja el virus infeccioso completo.

- Naturaleza de la patogenicidad, virulencia, infecciosidad, alergenicidad, toxicidad y vectores de transmisión de enfermedades:
No aplica.
- 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:
No se producen
- 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:
El plásmido utilizado para la modificación y los fragmentos de RNA utilizados no existen en la naturaleza. El virus rSARS-CoV-ΔE rescatado a partir de él tampoco. El hábitat natural del virus SARS-CoV silvestre, sin modificaciones es el ser humano.
- Participación significativa en procesos ambientales (Fijación del nitrógeno, regulación del pH., etc):
El virus rescatado así como el plásmido parental y los fragmentos de RNA utilizados en la generación del plásmido no tienen efecto sobre el medio ambiente porque no se encuentran en él.
- Interacción con otros organismos del entorno y efectos sobre éstos (incluyendo las probables propiedades competitivas, patogénicas o simbióticas):
El virus rescatado no se encuentra de forma natural en la naturaleza, por lo que solo interaccionaría con cualquier organismo en caso de escape accidental. Los fragmentos de RNA viral utilizados y el plásmido generado tampoco se encuentran en la naturaleza.



- Capacidad de formar estructuras de supervivencia (como esporas o esclerocios):
El virus rescatado no es capaz de formar estructuras de supervivencia, pero en caso de escape accidental sería capaz de transmitirse por el aire, teniendo un efecto mínimo sobre humanos ya que está altamente atenuado *in vivo*.
Los fragmentos de RNA virales tampoco están en la naturaleza.

1.2. Organismo donante.

El coronavirus humano SARS-CoV proviene de pacientes, en los que causa un síndrome respiratorio agudo severo. Se generará un cDNA del genoma de este virus al que se le deletará el gen E. Este cDNA se generará a partir de fragmentos de RNA viral procedentes del CDC (Atlanta, EEUU) y en ningún caso se manejará el virus infectivo en el proceso. Este cDNA se clonará en un cromosoma artificial de bacterias.

- 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. Pero como en todo momento se evitará el uso del SARS-CoV utilizando su cDNA, se evitarán los riesgos indicados.
- 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: No aplica

1.3. Inserto.

- Identidad y función específicas del inserto (genes):
El inserto que se pretende introducir en el cromosoma artificial de bacterias corresponde a la secuencia de SARS-CoV con el gen E deletado.
El gen S codifica las espículas del virus, determinantes del tropismo viral. Los genes M y E están implicados en el ensamblaje y salida del virus, por ello al haberse



delecionado el gen E el virus rescatado es defectivo. El gen N interacciona con el RNA para formar la nucleocápsida.

- Nivel de expresión del material genético insertado:
Los genes se van a introducir bajo la secuencias reguladoras de la cepa Urbani, por lo que el nivel de expresión de dichos genes será el mismo que el nivel de expresión del virus silvestre excepto el gen E que no se expresará al estar delecionado. No se esperan cambios de expresión con respecto al virus silvestre, pero este punto se analizará convenientemente.
- Fuente del material genético e identidad del organismo u organismos donantes y características, si procede:
El organismo donante es la cepa Urbani de SARS-CoV.
- Historia de las modificaciones genéticas previas, si procede:
La delección del gen E se realizará mediante técnicas de clonaje convencional, partiendo de los fragmentos de RNA, se generarán fragmentos de cDNA que se clonarán en un cromosoma artificial de bacterias.
- Situación del material genético insertado (posibilidad de activación o desactivación de los genes del hospedador debido a la inserción):
El plásmido en el que se van a introducir las secuencias de SARS-CoV no se integra en el cromosoma del huésped, por lo que no se preve que se produzca inactivación o activación de ningún gen del hospedador, aunque sí se podría producir alguna variación en la expresión de algunos genes del hospedador como consecuencia de la expresión del virus, aspecto que se va a estudiar previamente en animales de experimentación.

1.4. Vector.

- Naturaleza y fuente del vector: 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: el vector no queda en el MMG final
- 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.

El MMG resultante es un virus SARS-CoV defectivo en el gen E

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



está altamente atenuado mediante la eliminación de un gen esencial.

- Comparación de la patogenicidad del microorganismo modificado con la del receptor o (en su caso) del organismo parental:
La patogenicidad del virus defectivo que se rescatará a partir del BAC es mucho menor que la del virus silvestre del cual procede, ya que se le ha eliminado el gen E, que es un gen estructural. El virus defectivo crece más despacio que el silvestre, y además su virulencia es mucho menor según se ha demostrado *in vivo*.
El virus defectivo con el que se va a trabajar está altamente atenuado en animales, en los que la enfermedad es parecida a la de humanos, por lo que se preve que en humanos la situación sea la misma que con los animales.
 - Capacidad de colonización prevista:
El MMG será capaz de colonizar la especie humana, pero será eliminado rápidamente de esta, por ser un virus altamente atenuado y con capacidad de replicarse disminuida.
 - Si el microorganismo es patógeno para personas inmunocompetentes:
El virus rescatado no es patógeno por estar atenuado.
 - Enfermedades causadas y mecanismos de transmisión, incluidas la capacidad de invasión y la virulencia:
La virulencia del virus defectivo es menor que la del virus SARS-CoV parental, como se ha determinado en hamsters.
En humanos no se sabe si podría causar una neumonía mucho más leve que la causada por el virus parental o si por el contrario no causaría ninguna enfermedad.
- ✓ Dosis infecciosa: no se conoce
 - ✓ Posible alteración de la ruta de infección o de la especificidad tisular: no se conoce
 - ✓ Posibilidad de supervivencia fuera del hospedador humano: El virus necesita el hospedador humano para reproducirse y sobrevivir.
 - ✓ Estabilidad biológica: no se sabe
 - ✓ Pautas de resistencia a los antibióticos: no aplica
 - ✓ Alergenicidad: No se espera que el virus cause reacciones alérgicas, ya que no se ha descrito que SARS-CoV las cause.
 - ✓ Toxigenicidad: No se espera que el virus sea tóxico, ya que el virus del que deriva, SARS-CoV, no lo es.
 - ✓ Disponibilidad de terapias apropiadas y de medidas profilácticas: No se necesitan ya que el virus está altamente atenuado. Para el caso de SARS-CoV se ha visto que el fármaco que mejor inhibe la replicación



viral es el interferón- γ .

1.5.2. Efectos para el medio ambiente.

- Ecosistemas a los que el microorganismo podría pasar accidentalmente a partir de la utilización confinada:
La cantidad de virus con la que se trabaja en el laboratorio es suficientemente pequeña para prever que aunque escapara del laboratorio, no sería suficiente dosis para infectar ninguna persona ni animal. Por lo que no pasaría a ningún ecosistema.
- Supervivencia, multiplicación y grado de diseminación previstos para el microorganismo modificado en los ecosistemas correspondientes:
En el caso de que el virus llegara a diseminarse accidentalmente por medio del aire (hecho altamente improbable por las cantidades que se manejan en el laboratorio y por las propias características de contención del laboratorio), podría sobrevivir en el medio ambiente, dentro de huéspedes humanos, pero el no poderse replicar prácticamente, sería rápidamente eliminado del organismo gracias al sistema inmune del mismo.
- 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:
En caso de que se liberaran al entorno, no se producirían interacciones, ya que la cantidad de virus que entraría en los organismos, sería insuficiente para interactuar significativamente con los mismos.
- Efectos conocidos o previstos sobre plantas y animales como, por ejemplo, patogenicidad, toxicidad, alergenicidad, vector de patógenos, pautas alteradas de resistencia a los antibióticos, alteraciones de tropismos o especificidad de hospedador, y colonización:
El virus generado no es patógeno en animales. Tampoco es patógeno en humanos, por habersele delecionado un gen estructural. Para plantas tampoco sería patógeno porque no puede entrar en las mismas, por no tener estas los receptores apropiados.
Tampoco se esperan casos de toxicidad y alergenicidad 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 hiperatenuación del OMG tras la delección del gen E, 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 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.

3.2. Concentración y escala utilizadas.

Para rescatar el virus defectivo se utilizarán células de riñón de mono Vero E6 en un volumen máximo de 10 frascos F25, que equivalen a 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).

El rescate de virus defectivos producidos a partir del pBAC-rSARS-CoV- Δ E se realizará en células Vero E6. 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.)

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.