



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

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: [Centro Nacional de Biotecnología \(CSIC\)](#)
Dirección postal: [c/ Darwin 3.](#)
[28049 – Madrid](#)

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: [Fernando Rojo de Castro](#)
NIF: [50295113-R](#)
Cargo: [Director del CNB](#)
Tel: [91 585 45 03](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: direccion@cnb.csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: [Pablo Gastaminza Landart](#)
NIF: [44145453N](#)
Cargo: [Investigador Distinguido](#)
Tel: [91 585 4678](#)
Fax: [91 585 4506](#)
Correo electrónico: pgastaminza@cnb.csic.es

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

Nombre y apellidos: [Fernando Usera Mena](#)
NIF: [00694865-N](#)
Cargo: [Responsable del Servicio de Seguridad Biológica y Protección Radiológica](#)
Tel: [91 585 45 41](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es

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

[Fernando Usera Mena](#)



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

SI ☒ NO ☐

Actividad financiada por el Plan Estatal de Investigación Científica SAF2017-87846-R

- 3) Instalación donde se va a desarrollar la actividad de utilización confinada (*cumplimente si previamente ha sido comunicada/autorizada para este tipo de actividades; en caso contrario, cumplimente el Formulario Parte B*).

a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación: 7/03/2001

b) Número de referencia del expediente: A/ES(00/I-8)

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Finalidad de la actividad:

Producción segura de virus infecciosos recombinantes del dengue (DENV) a partir de su genoma (cDNA clonado), con objeto de estudiar aspectos básicos de su biología, incluyendo los factores celulares y virales que regulan la infección por DENV en cultivo celular. Dicho genoma está basado en una cepa aislada de un paciente (cepa NGC, serotipo 2).

No se plantea modificar genéticamente ningún organismo, sino producir un virus recombinante para su uso confinado en tareas de investigación biomédica en cultivo celular. En concreto, se empleará un plásmido bacteriano (pDVWS601), previamente generado por otro laboratorio, que contiene la secuencia completa del genoma viral en un vector (pWSK29) que permite su transcripción in vitro para la producción de genomas virales completos en forma de RNA desnudo. Dicho material genético permitirá simular una infección viral mediante su introducción en células susceptibles que producirán el virus infeccioso recombinante. Por lo tanto, en esta propuesta se considerará el virus del dengue como organismo receptor que ha sido insertado en un plásmido bacteriano.

La construcción plasmídica descrita aquí (pDVWS601) ha sido generada con anterioridad por Gualano et al. (PMID 9519821) y han sido empleadas para rescatar virus recombinantes en diversos laboratorios NCB3 en el mundo.

- 2) Clasificación de la actividad:

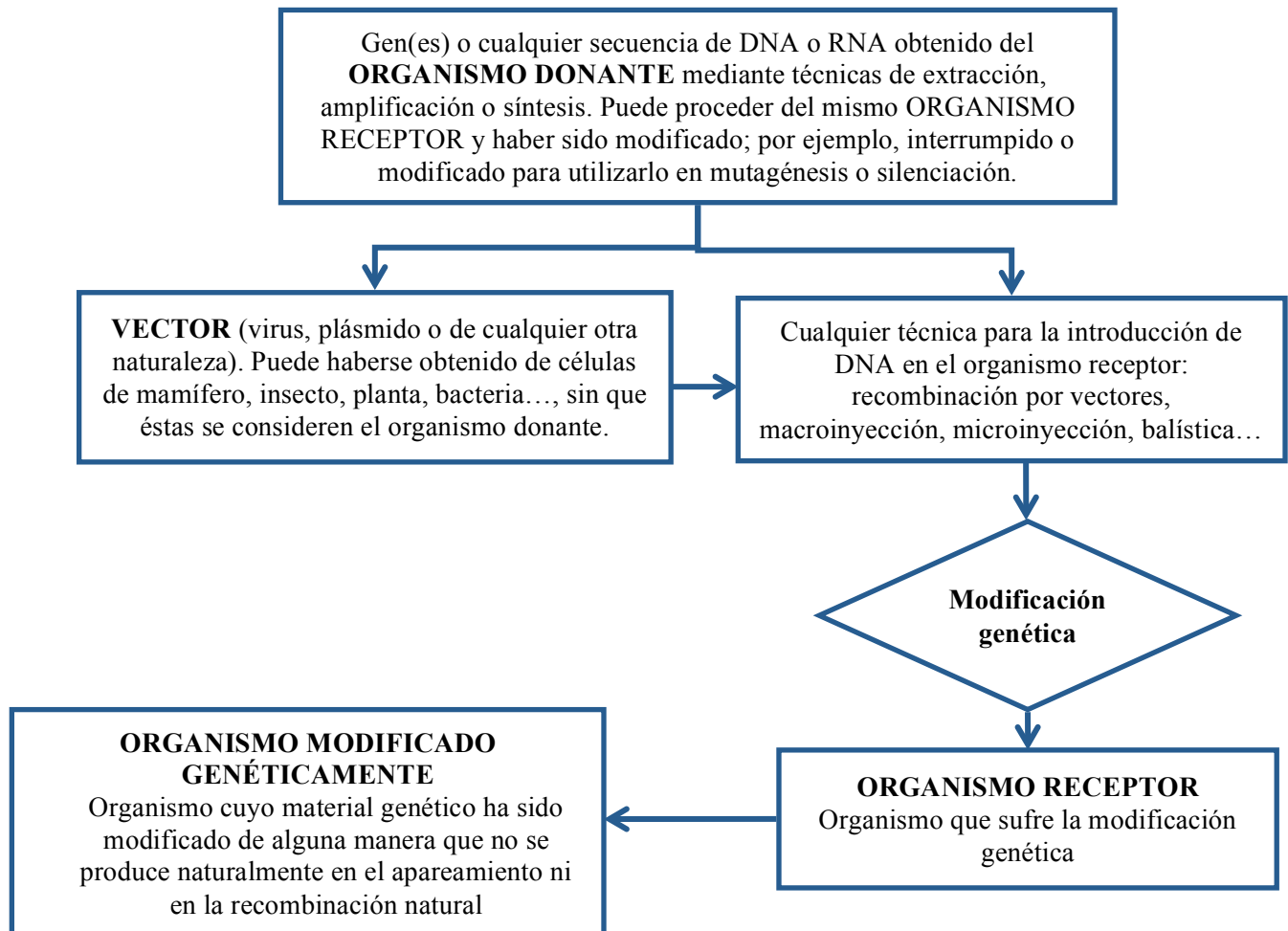
(Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y el anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos



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

- Tipo 1 ☐
- Tipo 2 ☐
- Tipo 3 ☒
- Tipo 4 ☐

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





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

1) Nombre científico:

Taxonomía: [Flaviviridae; Flavivirus; virus del dengue](#)

Nombre común: [virus del dengue](#)

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

[El virus del dengue puede ser aislado de diversos tejidos de humanos infectados, así como de mosquitos transmisores de la enfermedad mediante técnicas virológicas convencionales en cultivo celular. Para su identificación inequívoca se requieren técnicas de biología molecular.](#)

b) Técnicas de identificación:

[Mediante transcripción inversa y PCR de tejidos o cultivos infectados. Adicionalmente técnicas de inmunomarcaje con anticuerpos específicos frente a proteínas virales para Western-Blot, inmunomicroscopía y ELISA.](#)

c) Marcadores genéticos:

[Se dispone de la secuencia completa del virus DEN-2 \(NGC\) acceso Genbank AF038403.1 descrito en Gualano et al. 1998 \(PMID 9519821\). Inclusión de mutaciones silenciosas para generar dianas únicas HpaI y MluI en nucleótidos 7404 \(T→G\) y 9732 \(C→A\) respectivamente. Descrito en Pryor et al. 2001 \(PMID 11716094\).](#)

d) Marcadores fenotípicos:

[El virus produce efecto citopático en los cultivos celulares infectados. La presencia de virus puede medirse mediante ensayo de placa convencional en cultivo celular.](#)

e) Estabilidad genética:

[La comúnmente asociada a virus con genoma de RNA. Se trata de virus con elevada tasa de variabilidad genética. En el caso de la propagación en cultivo celular, su adaptación suele resultar en atenuación en hospedadores naturales. De cualquier forma se observarán las precauciones adecuadas para minimizar la adaptación del virus.](#)

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

[Se han realizado las modificaciones genéticas silenciosas a efecto de marcador genético \(ver punto 2c\)](#)

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI ☒

NO ☐

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

[El virus es patogénico para humanos, aunque infecta asintóticamente a mosquitos.](#)

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

El virus del dengue ha sido asignado al grupo de riesgo 3.

- a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

La mayoría de las infecciones (80%) cursan con fiebre acompañada de dolores musculares y lesiones cutáneas tipo rash, sin complicaciones adicionales. En algunos casos (<5%), y especialmente en niños y jóvenes adultos, la infección puede evolucionar hacia fiebre hemorrágica o shock asociado a dengue. La fiebre hemorrágica asociada a dengue es también autoresuelta, aunque requiere tratamiento médico para la restitución de fluidos. Los síntomas de infección usualmente comienzan de 4 a 7 días después de la picadura del mosquito y típicamente duran de 3 a 10 días. Para que ocurra la transmisión, el mosquito debe alimentarse de una persona durante un período de 5 días cuando hay grandes cantidades de virus en la sangre; este período generalmente comienza un poco antes de que la persona se vuelva sintomática. Algunas personas nunca tienen síntomas importantes, pero aún pueden infectar a los mosquitos. Después de que el mosquito adquiera la infección por ingesta de sangre, el virus requerirá una incubación adicional de 8 a 12 días antes de que pueda transmitirse a otro ser humano. El mosquito permanece infectado el resto de su vida, que puede durar días o algunas semanas.

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

SI ☐

NO ☐

Porqué:

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

Sí

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

El solicitante tiene una amplia experiencia de más de 13 años en cuanto a la producción de virus recombinantes empleando como modelo el virus de la hepatitis C.

Por otro lado, las actividades solicitadas se realizan en instalaciones NCB3 de diversos laboratorios internacionales desde el año 2003.

La construcción plasmídica descritas aquí (pDVWS601) han sido generadas con anterioridad por Gualano et al. (PMID 9519821) y han sido empleadas para rescatar virus recombinantes en diversos laboratorios NCB3 en el mundo.

- 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?:

NO

En caso afirmativo:

- b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:



- i) esporas ☐
- ii) endosporas ☐
- iii) quistes ☐
- iv) esclerocios ☐
- v) esporas asexuales (hongos) ☐
- vi) esporas sexuales (hongos) ☐
- vii) otros, especifíquese

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

[Presencia de comunidades de mosquitos.](#)

d) Posibles nichos ecológicos:

[Mosquitos \(*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*\)](#)

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

[No definido](#)

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

[No aplica](#)

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

[Infecta a humanos y a mosquitos](#)

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

[Global](#)

12) Hábitat natural del organismo:

[Preferentemente en zonas tropicales y subtropicales. Asociado a la presencia del vector.](#)



IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: **NO APLICA**

Taxonomía:

Nombre común:

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: **NO APLICA**

3) Método de obtención:

a) Extracción ☐

b) PCR ☐

c) Síntesis *in Vitro* ☐

4) Función del gen/genes en el organismo donante: **NO APLICA**

5) ¿Es patógeno o nocivo de cualquier otra forma (*incluidos sus productos extracelulares*) el organismo donante, vivo o muerto? **NO APLICA**

SI ☐ NO ☐

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i) seres humanos ☐

ii) animales ☐

iii) plantas ☐

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

NO APLICA

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

NO APLICA

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

NO APLICA



V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

- a) Inserción de material genético ☐
- b) Deleción de material genético ☐
- c) Sustitución de bases ☒
- d) Fusión celular ☐
- e) Otros, especifíquese: [Clonaje del genoma completo de un aislado clínico.](#)

2) Finalidad de la modificación genética:

[Introducción de mutaciones sinónimas para permitir la discriminación entre virus recombinante y virus silvestre.](#)

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

[Se ha producido un cDNA completo del virus dengue de la cepa NGC \(serotipo 2\) por RT-PCR, introduciendo mediante oligos mutagénicos mutaciones marcadoras que no alteran las proteínas codificadas. Dicho inserto \(ver más adelante\) se ha clonado en el vector pWSK29 \(ver más adelante\) para dar lugar al vector pDVWS601, que constituye el OMG.](#)

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

SÍ ☒ NO ☐

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

[Plásmido bacteriano pWSK29: El vector empleado contiene las secuencias mínimas para la propagación de los plásmidos en E.coli y conferir resistencia a ampicilina a las bacterias portadoras del plásmido. Contienen además los promotores de las ARN-polimerasas del fago T7 para permitir la transcripción del inserto in vitro. El ARN viral no se puede expresar en células de mamífero a partir del plásmido por lo que tiene que ser transcrito in vitro antes de ser introducido por transfección en las células diana.](#)

b) Si se trata de un virus: [NO APLICA](#)

Es defectivo en replicación SÍ ☐ NO ☐

c) Aportar mapa de restricción del vector (*funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes en el vector*):

*E. coli*

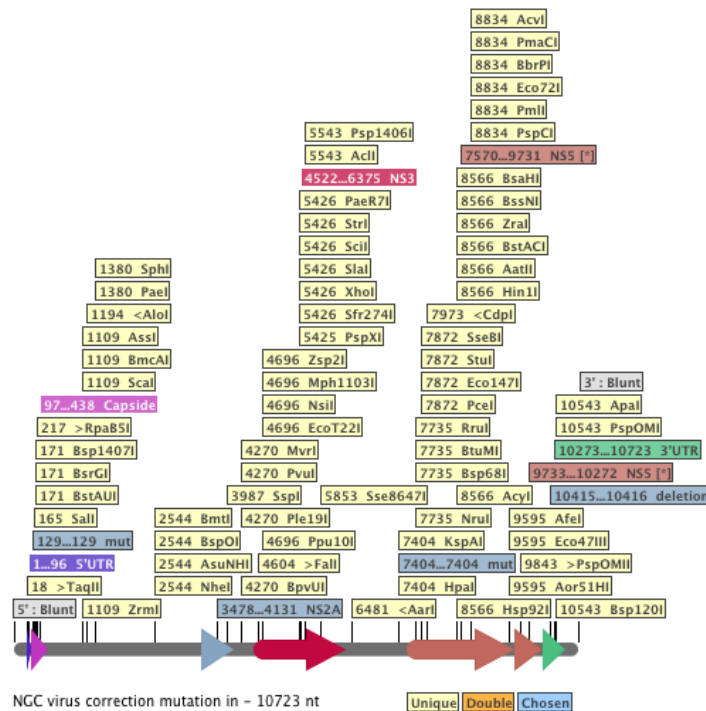
i) factores de movilización: No codifica factores de movilización.

No aplica.

¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos? **Si.**

5) Información del inserto:

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



Dengue NGC cDNA

aggtgttagctactgctggaccgacaaagacagattctttgaggaggactaagctcaacgtagtgttcaacagtttttaatt
agagagcagatctctgatgaataccaacgaaaaaaggcgagaaatagcctttcaatatgctgaaacgcgagagaaaac
gcgtgtcgtactgtacaacagctgacaaaagagatttctacttggaaftgctgcagggacgaggaccattaaaactgttcatg
gccctgggtggcgttcttctgttcttaacaatcccaccaacagcagggtactgaagagatggggaaacaattaaaaaatc
aaaaagccattaatttttgaggaggttcaggaaaagagattggaaagatgctgaacctgtgaacaggagagcgagaactg
cagcgcatgattctgtgatttcccaacgagtgcgttccatttaccacacgttaacggagaaaccaacatgactgtc
agtagacaagagaagggaaaagtcttctgtttaaaaacgaggatgggtgtgaacatgtgtacctcatggccatggacct
tggtaattgtgtgaagatacaatcacgtacaagtgtcttttctcaggcagaatgaaccagaagacatagattgttgg
gcaactctacgtccacatgggttaacttatgggacgtgtaccaccacaggagaacacagaagagaaaaaagatcagtgcca
ctcgttccacatgtgggaattgggactggagacacgaactgaacatgtagtcatcagaaggggccttggaacatgcgcca
gagaattgaaactgtgacttctgagacatccaggctttaccataattggcagaactctggcataccatgacgaacgac
atttccaaagagccgtgattttctactctgacagctgtcgtctcttcaatgacatgctgtgcataggaataatcaaat
agagactttgtagaagggggttcaggagggaagctgggtgacatagcttgaacaatggaagctgtgtgacgacgatggc
aaaaacaaaccaacattggattttgaactgataaaaacagaagccaacaacctgccacttaagggaagtactgtatag
aggcaaaagctgaccaacacaacaacagatttctcgtgcccaacacaaggagaaccagcctaattgaagagcaggacaaa
aggttcgtctgcaaaacacctattgttgacagaggatggggaaaatggatgtgattatttggaaaaggagcattgtgac
ctgtctgtatgttcacatgcaaaaagacatgaaaaggaaaagctgtgcacaacagaacttgaataccattgtgataa
cacctcactcagggggaagagcatgcgtcggtaatgacacagtcacaaacatgcgaaggaaatcaaaatacacccacagat
tccatcacagaagcagagtgtgacaggctatggcactgtcacgatggagtctctccgagaacgggcctcgacttcaatga
gatggtgtgtcgtcaaatggaaaataaaagcttggctgtgtgcacaggcaatggttctagacctgccgttgccatgctgc
ccggagcggacacacaagatcaaatggatcacagaagagacattggtcactttcaaaaatccccatgctgaagaacaacag
gatgtgtgtgttttggatccaaagaaaggggccatgacacagcactcacaaggggccacagaataacagatgtcatcagg
aaacttactgttccaggacacatctcaagtgcaggctgaggatggacaaactacagctcaaaaggatgtcatcatctatgt
gcacaggaaaagtftaaagtgtgaaaggaaatgacagaacacacaatggaacaatagtftacagagtacaatatgaagg
gacgggttctcatgtagaatcccttttgagataatggatttggaaaaaagacatgttttagtgcctgattacagtcaa
cccaatcgtaacagaaaaagatagcccagtcacacatagaagcagaacctctcattcgagacagctacatcatcataggag
tagagccgggacaaattgaagctcaactggttttaagaagggaagtctatcgccaattgattgacacataaatgaggggga
cggaaggagaattggccatttttagtgcacacgcttgggaatttggatccttgggaggagtgtttacatcataatgagaaggc
ttccacaaagatttggcagcaatctatgggctcttccttgcagtggtctgactgactgaataaactactatagagatca
tctcacaagatttggcagcaatctatgggctcttccttgcagtggtctgactgactgactgaataaactactatagagatca



ttatcacatgtaggaatgaattcacgcagcacctcactgtctgtgactagtattggaggagtcgtgacgctgtat
ttgggagtattgtgcagccgatagtggtgctgtgagctggaaaaaacaagaactgaagtgtggcagtgaggatttt
catcacagacaactgtcacacatggacagacaatacaagttccaaccagaatcccccaagctagcttcagctatcc
agaaagctcatgaagaggcattttgtggaatccgctcagtaacaagactggaaaatctgatgtggaacaaataacacca
gaattgaatcacatttcatcagaaaaagagtgagtgactattatgacaggagacatcaaaggaaatcatgcaggcagg
aaaacgatctctgcagccccagcccactgagctgaagtattcatggaacacatggggcaagcgaaaatgctctctacag
agtctcataccagaccttctcattgatggccccgaacagcagaatgccccacacaaacagagcttggaattcgtg
gaagttgaagactatggctttgagtgattaccaccaatatatggctaagttgagagaaaagcaggatgtattctgcga
ctcaaaactcatgtcagcgccataaaagacaacagagccgtccatgccgatatgggttattggatagaagtgcactca
atgacacatggaagatagagaagccttcttcatcgaagttaaagctgccactggccaaagtacacacccctctggagt
aatggagtgtgaaagtgaatgataatccaaagaatttcgtggaccagtgtcacacacaactacagaccaggcta
ccatacacaacagcaggacctggcatctagtgtaagcttgagatggactttgattctgcgaaggacacagtggtgg
tgactgaggactgtggaatagaggacctctttaagaacaactactgcctctggaaaactcataacagaatggtgctgc
cgatctgcacattaccaccctaaagatacagagtgaggacggatgctgtgacgggatggaaatcagaccattgaaaga
gaaagaagagaatttgtaacctctgtgcacagccggacatgggcagattgacaacttttactaggagtcttgggaa
tggcattgtcttggaagaatgtcaggaccggagtaggaacgaacatgcaatactactagtgcagtcttctgtg
acattgatcaggggaacatgctcctttagagacctgggaagagtgtggttatgtggcgctactatgacggatgacat
aggatggcggtgacttatctgcccactagcagcctcaagtcagaccaacttttgagctggactactcttgagaa
agttgacctcaaggaattgatgatgactaccatggaatcgtactctctccagagaccataccagagaccattctt
gaactgactgatgcgttagccttggcatgatgtcttaaaatggtagaaaaatggaaaagtatcaattggcagtgac
tatcatggctatctgtgcgtcccaaatgcatgtattacaaaacgcatggaaaagtgaattgcacaattattggcagtg
gtctccgtttccctactgttctaactctcacagcagaagcggaattggataccattagcattgacgatcaagggtctc
aatcaacagctatttttcaaacacctttcaagaaccaacaagaaaaggagctggccactaaatagggtatcatggc
agtcgggagtgtgagcattttggcagttcactcctaaagaatgacattccatgacaggaccattagtggctggagggc
tctcactgtgtgtactgtctcactggacgatcgccgatttgaactggagagagccgcatgtcaaatgggaagat
caggcagagatacgaagcagtccaatcctgtcaataacaatatcagaagtggtagcatgtcgataaaaaacgaaga
ggaagaacaacactgaccatactcattagaacaggattgtgtgtagtctcaggacttttctgtatcaataaccaatca
cggcagcagcatgtgacctgtgggaagtgaagaacaacggcgctggagtattgtggagtgtcccttcacccccaccgtg
ggaaaaggctgaactggaagatggagcctatagaatcaagcaaaaagggaattcttgatattccagatcgagccggagt
ttacaagaagggaacattccatacatgtggcatgtcacacggcgctgttctaagtcataaaggaaaaggagattgaac
catcatggcgagcttaagaagacctaatatcatatggaggaggctggaagctagaaggagaatggaaggaaaggagaa
gaagtccaggtcttgcatgtgagcctggaaaaatccaagagccgtccaaacaaaacctggtcttttcaaaccaacgc
cggaaacctaggtgctgtctgtgactttctctggaacctcagatctccaatcagacaaaaaggaaaagttg
tgggtctttatgtaattgtgtttacaaggagtgagcagatgtgagtgctatagccagactgaaaaagatttgaa
gacaactcagagatgaagatgatatttttcaaaagagaataatgacctatgacacctccaccaggaagcggaagac
gaagagataccttccgcatatgcagagagcctataaaacggcgctgaggacattaatcctggccccactagagtcg
tggcagctgaaatggaggaagccctaagaggacttcaataagatacacaacccagccatcagagctgagcacaccggg
cgggagattgtgacctaatgtgtcatgccattcactatgaggctgtatcaccagttagagtgccaaattacaacct
gatcatcatgagcgaagccatttcacagaccagcaagtatagcggctagaggatacatctcaactcagtagagatgg
gtgaggcagctggattttcatgacagccactcctccgggaagcagagaccattccctcagagcaatgcaccaatcatg
gatgaagaaagaaaatccctgaacgttctgtgagttctggacatgagtggtcacggattttaagggaagactgtttg
gttctccaaagtataaaagcaggaatgatatagcagctgtgctgagaaaaatggaaaagaaagtatacaactcagta
ggaagaccttggattctgagtatcaagactgaaccaatgattgggacttctgtgtcacaactgacatttcagaatg
ggtgccaacttcaaggctgagagggttatagacccagacgtgcatgaaccagttataactaacagatggtgaagagcg
ggtgatcctggcaggacctatgccagtaccactctagtgcagcacaagaagagggaataggaagaaatcaaaaa
atgaaaatgaccagttacatatacatgggggaacctctggaaaatgatgaagactgtgcacactggaaagaagctaaaatg
ctcctagataacatcaacacactgaaggaatcattcttagcatgttcgaaccagagcgtgaaaagggtggatgccattga
tggatgaataccgcttgagaggagaagcaaggaaaacctttgtgacctaatgagaaggagacctaccagctctggtgg
cctacagagtggcagctgaaggcatcaactacgcagacagaaggtggtgtttgatggaattaagaacaaccaatcttg
gaagaaaatgtggaggtggaatctggacaaaagaagggaaggaagaaatgaaacccagatgttggtgagtgccaggat
ctactctgaccactgacgttaaaggaattcaaggatttgagctggaagaaagtcctgacctgaacctaatcacag
aaatgggtaggcttccaactttcatgactcagaaggcaagagacgcactggacaacttagcagtgctgcacacggctgaa
gcaggtggaaggcgataacatcatgctcagtgaaactgcccagaccctggagacattgctttactgacacttctggc
tacagtcacaggaggaatcttttatctgtgatgagcggaaaggggtatagggaagatgacctgggaatgtgtgcataa
tcacggctagtatttctttaggtacgacaaaatacagccacactggatagcagcttcaataatactggagttttctc
atagttttgcttattccagaaccagaaaagcagagaacaccccaagataaccaattgacctacgttgcatagcatcct
cacagtgtggtggccgcaacctggaacagagatgggttctggaaaaaacgaagaaagatctcggttggtgggaagcatta
caaccagcaacccgagagcaacatctggacatagatctacgtcccgcatcagcatggacgtgtatgtgtggccaca
acattgtcacaccaatgttgagacacagcattgaaaattctcagtgaaactgtccctaacagctattgccaaccaagc
cacagtgttaattgggtcttgggaaggatggccattgtcaagatggacatcggagttcccccttctgccattggatgct
actcaagtaacccataactctcacagcagctcttttactggtagcacattatgccatcatagggccaggactc
caagcaaaagcaaccagggaagctcagaaaagagcagcagcgggcatcatgaaaaaccaactgtcgatggaataacagt

gattgacctagatccaataccctatgatccaaagttgaaaagcagttgggacaagtaatgctcctagtcctctgcgtga
ctcaagtggtgatgatgaggactacatgggctctgtgtgagggcgttaaccttagcgaccggcctatctccacattgtgg
gaaggaaatccagggagggtttggaactaccattgcagtgtaaatggttaacatttttagaggaggacttggccgg
agctggacttctctttccatcatgaagaacacaaccaacacgagaaggggaactggcaacataggagagacgttggag
agaaatgaaaaagccgattgaacgcattgggaaaaagtgaattccagatctacaagaaaagtgaatccaggaaagtggat
agaaccttagcaaaaagagcattaaaaagaggagaacggaccatcacgctgtgtcgcaggctcagcaaaactgagatg
gttcgtcagagaaatattggtcacaccagaagggaagtgtggacctcgttgcggcagaggaggctgtcatatactatt
gtgggggactaaagaatgaagagaagtcaaaaggcctgacaaaaggaggaccaggacatgaagaacctatccccatgtca
acatatgggtggaatctagtacgtcttcaaaaggagttgacgttttcttactccgccagaaaagtgtgacacattgtt
gtgtgacataggggagtcgtcaccaaatcccacggtagaagcaggacgaacactcagagtccttaacttagtgaaaatt
ggtgaacaacacaccaatttgcataaagggttcaaccatacatgccctcagtcatagaaaaatggaagcacta
caaaaggaaatattggaggaccttagtgaggaaatccatctcacgaaactccacacatgagatgtactgggtatccaatgc
ctccgggaacatagtgatcatgtaacatgattcaaggatgtgtatcaacagattcacaatgagacacaagaaagcca
cttaggaactcattgtagcctcggaagcgggaacccgcaacatcggaattgaaagtggagatacacaacactagacataatc
gggaaaagaataaaaaataaaacaagagcatgaacatcatggcactatgaccaagaccaccatacaaaacgtgggc
ttaccatggcagctatgaacaaaaaaactggatcagcatcatccatggtgaacggagtggtcagactctgacaaaac
cttgggacgtgctcccatgtgtgacacagatggcaatgacagacacgactccatttggacaacagcgcttttaagaa
aaagtggacacgagaaccaagaaccgaagaaggcacaaaagaaactaatgaaatcacggcagagtggtttgaaaaga
actagggaagaaaaagacacctaggatgtgcactagagaagaattcacaagaaagtgagaagcaatgcagccttggggg
ccatattcactgatgagaacaagtggaaagtcggcacgtgaggtgttgaagatagtaggttttgggagctggtgacaag
gaaaggaaatccatcttgaagcgaagtgtgaaacatgtgtataacatgatgggaaaaagagagaagaagctaggggga
gttcggcaaggcaaaaggcagcagagccataggtacatgtgtggttggcagcgtctcttagagttgaagccctaggat
tcttgaatgaagatcactgttctccagagaaactccttagtgagtggaaggagaagggtgcacaagctagggttac
atttaagagacgtgagcaagaagaggagggaagcaatgtatgccgatgacaccgcaggatgggacacaagaatcacat
agaagacctaaaaaatgaaagatgttaacaaccacatggaaggagaacacaagaactagccgaggccatttcaaat
taacgtacaaaacaaggtggtgcgtgtgcaaaagcaaacaccaagaggcacagtaatggatatcatatcgagaagagac
caaaaggtagtgacaagaagtggtacatggaactcaatactttaccaaatatggaagcccaactaatcagacagatgga
gggagaaggtcttcaaaagcattcagcacctgacagtcacagaagaaatcgccgtgcaaaactggttagcaagagtag
ggcgcgaaggttatcaagaatggccatcagtgagatgattgtgtgtgaaacctttagatgacaggttcgcaagcgt
ttaacagctcaaatgacatgggaaaggttaggaaagacatacaacaatgggaaccttaagaggatggaacgattggac
acaagtgccttctgttcacacatttccatgagttaatcatgaaagacggccgctactgttagttccatgcagaaacc
aagatgaactgattgttagagcccgaatttccaaggagctgggtgttcttgcgagagacggcctgttggggaagtcc
tacgcccgaatgtggagctgtgacttccacagacgtgacctcaggctggcggctaattgctattgtcggcagctccc
atcacattgggtccaacaagttagaacaacctgttcatacacgccaaacatgaatggatgacaacggagacatgctga
cagcttggaaacaggggtgtggaattcaagaaaacccatggatggaagcaaaactccagtggaatcatgggaggaatccca
tacttgggaaaagagaaagaccaatgtgtcggctcattgattgggctaacaagcaggggccacctgggcaaaagaaatcca
aacagcaataaatcaagttagatcccttataggcaatgaggaatacacagattacatgccatccatgaaaagattcagaa
gagaagagggaagaggcaggagtcctgtgtgtagaaggcaaaactaacatgaacaaggctagaagtcaggtcggattaagc
catagtacgaaaaaactatgtactgtgagccccgtccaaggacgttaaaagaagtacggccattacaaatgccatag
cttgagtaaaactgtgcagcctgtagctccacgtgagaaggtgtaaaaaactgtggaggcccaaaacatggaagctgtac
gcatggcgttagtgactagcggtagagagacccctcccttacaacatcgagcaacaatggggcccaagggtgagatga
agctgtagtctactggaaggcaggttagaggagaccccccaaaaacaaaacagcatattgacgtctgggaaaga
ccagagatcctgctgtcctcagcatcattccaggcacagaacgccagaaaatggaatggtgtgtgaatcaacaggt
tct

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

El inserto contiene el cDNA completo del virus DEN-2 (cepa NGC) acceso Genbank AF038403.1 descrito en Gualano et al. 1998 (PMID 9519821). Incluye regiones reguladoras flanqueando un único marco de lectura abierta que codifica todas las proteínas virales. La transfección del ARN derivado del inserto permite la producción de virus infeccioso. Se han incluido mutaciones silenciosas para generar dianas únicas HpaI y MluI en nucleótidos 7404 (T→G) y 9732 (C→A) respectivamente. Descrito en Pryor et al. 2001 (PMID 11716094).

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Transcripción inversa y PCR de fragmentos. Clonaje molecular mediante enzima de restricción en vectores plasmídicos intermedios. Descrito en Pryor et al. 2001 (PMID 11716094).



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

Poliproteína del virus dengue que se traduce como único marco abierto de lectura y se procesa post-traduccionamente en la célula transfectada para dar lugar a las proteínas virales: core, M, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5.

Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:

Presencia de regiones 5' y 3' no traducidas del genoma del virus del dengue esenciales para la producción de virus infecciosos.

e) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

SI

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

NO

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

Sí. Aunque se conocen las funciones principales de las proteínas virales, éstas son precisamente parte del objeto de estudio.



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?

Sí. El plásmido pDVWS601 ha sido generado con anterioridad por Gualano et al. (PMID 9519821)

En caso afirmativo:

- i) Número de copias: bajo número de copias
- ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido? Si

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

En caso afirmativo:

- i) número de copias:
- ii) localización cromosómica:
- iii) secuencias colindantes
- iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?:

c) Si se trata de un virus:

- i) La inserción es específica ☒
- ii) La inserción se produce al azar ☐
- iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas ☒

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

- iv) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación) ☒
- v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA) ☒
- vi) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas) ☒

Aportar toda la documentación al respecto.

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

- a) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese: NO
- b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese: NO
- c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar: NO
- d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese: NO



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

f) Marcadores específicos del OMG:

Inclusión de mutaciones silenciosas para generar dianas únicas HpaI y MluI en nucleótidos 7404 (T→G) y 9732 (C→A) respectivamente. Descrito en Pryor et al. 2001 (PMID 11716094).

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

La estabilidad genética del plásmido que contiene la secuencia del genoma viral es alta. De hecho se emplea esta estrategia para limitar la deriva genética típica de los virus RNA. Los virus de genoma de RNA son inherentemente inestables genéticamente. El rescate de virus a partir de cDNA clonado permite controlar mejor las características genéticas del virus que se manipula, lo cual reduce considerablemente los riesgos biológicos asociados.

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

No se ha descrito

5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:

g) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Para el plásmido que alberga la secuencia viral, mediante PCR de cultivos bacterianos.

Para el virus resultante de las operaciones descritas en el apartado VII, mediante transcripción inversa y PCR de tejidos o cultivos infectados. Adicionalmente técnicas de inmunomarcaje con anticuerpos específicos frente a proteínas virales para Western-Blot, inmunomicroscopía y ELISA.

h) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:

El virus del dengue puede ser aislado de diversos tejidos de humanos infectados, así como de mosquitos transmisores de la enfermedad mediante técnicas virológicas convencionales en cultivo celular. Para su identificación inequívoca se requieren técnicas de biología molecular.



VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

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

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

- a) Volumen máximo en el caso de microorganismos: 50 ml
- b) Número de plantas: 0
- c) Número de animales: 0

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada (*Debe concretarse lo más posible la duración de la actividad por ejemplo, teniendo en consideración la duración de la financiación de los proyectos a los que están asociados las actividades con los OMG*):

Se prevé un periodo mínimo de 5 años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.

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

Producción segura de virus infecciosos recombinantes del dengue (DENV) a partir de cDNAs clonados con objeto de estudiar aspectos básicos de su biología, incluyendo los factores celulares y virales que regulan la infección por DENV en cultivo celular. Dicho genoma está basado en una cepa aislada de campo que ha sido alterada genéticamente para diferenciarlos de la cepa parental.

5) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa (*señalar nombre y ubicación*), y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG. En el caso de centros españoles, indicar el número de notificación si se conoce:

El OMG se ha enviado en forma de DNA plasmídico. El plásmido pDVWS601 descrito en Gualano et al 1998 (PMID 9519821) ha sido cedido por Andrew D. Davidson (Universidad de Bristol, UK) y enviado por correo ordinario como DNA purificado.

6) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo en virtud de la legislación aplicable¹ (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*): NO APLICA

¹ Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- (ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas) del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones
- Reglamento (CE) n° 1/2005 del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas 64/432/CEE y 93/119/CE y el Reglamento (CE) n° 1255/97.
- Reglamento (CE) n° 1946/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente [Diario Oficial L 287 de 5.11.2003].
- Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad. Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: <https://bch.cbd.int/protocol/>

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

Preparación de stocks virales e infección: Se producirá virus infeccioso de la cepa prototípica DENV-2 Nueva Guinea C (NGC) (AF038403) usando transcritos de ARN in vitro preparados a partir del plásmido pDVWS601 linealizado con XbaI y utilizando el kit mMESSAGE mMACHINE T7 (Ambion). Se emplearán 5 µg de ARN transcrito in vitro para transfectar 4x10⁶ células BHK-21 mediante transfección con Lipofectamine 20000. Seis horas después de la transfección, el medio de cultivo se sustituirá por medio fresco. Los sobrenadantes, máximo 5 ml, serán recogidos 3 días después de la transfección y filtrados (0,45 µm, Corning).

La determinación de la infectividad de los sobrenadantes se realizarán mediante titulación en célula Vero empleando medio semi-sólido. Tras la inoculación con diluciones seriadas de los sobrenadantes, las células serán incubadas en medio semi-sólido durante 72 horas. Para determinar el título, las células infectadas serán tratadas con 4% formaldehído-PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, con el objetivo de fijar los cultivos y de inactivar el virus infeccioso presente en el cultivo. En este punto, las placas serán transportadas al exterior, previa desinfección de sus superficies exteriores al abandonar la cabina de flujo laminar y en la exclusiva antes de abandonar la instalación P3. Dichas placas serán teñidas con cristal violeta para determinar el número de viriones infecciosos o unidades formadoras de placa por volumen (PFU/ml).

Los stocks de virus se producirán mediante inoculación de células Vero a una multiplicidad de 10⁻³ PFU/ célula e incubación a 37°C en el incubador de CO₂. Una vez propagado el virus a todo el cultivo (determinado por el efecto citopático del mismo), serán recogidos 3 días después de la infección y filtrados (0.45 µm, Corning), donde se esperan títulos entorno a 10⁷ PFU/ml y volúmenes máximos de 50 ml.

Los experimentos de infección se realizarán sobre células de hepatoma humano (Huh-7), empleándose volúmenes máximos de stock diluido entre 10 y 20 ml.

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

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.



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 Bioseguridad 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 sub-laboratorios 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.

X. GESTIÓN E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

- 1) Encargado de la gestión de residuos:

a) gestión interna:	SÍ	☒	NO	☐
b) gestión por una empresa externa:	SÍ	☒	NO	☐



Si es el caso, nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos: [HIBISA](#)

- 2) Inactivación de residuos: método, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados:

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.

XI. 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 Seguridad e Higiene en los laboratorios 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 Bioseguridad del CNB.

Cursos y seminarios:

- Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Bioseguridad 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 ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE** ¡Error! Marcador no definido.

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

- 1) Entidad
Nombre: [Centro Nacional de Biotecnología \(CSIC\)](#)
Dirección postal: [c/ Darwin 3.](#)
[28049 – Madrid](#)
- 2) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: [Fernando Rojo de Castro](#)
NIF: [50295113-R](#)
Cargo: [Director del CNB](#)
Tel: [91 585 45 03](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: direccion@cnb.csic.es
- 3) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos: [Pablo Gastaminza Landart](#)
NIF: [44145453N](#)
Cargo: [Investigador Distinguido](#)
Tel: [91 585 4678](#)
Fax: [91 585 4506](#)
Correo electrónico: pgastaminza@cnb.csic.es
- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
Nombre y apellidos: [Fernando Usera Mena](#)
NIF: [00694865-N](#)
Cargo: [Responsable del Servicio de Seguridad Biológica y Protección Radiológica](#)
Tel: [91 585 45 41](#)
Fax: [91 585 45 06](#)
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es
- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto
[Fernando Usera Mena](#)

II.



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

(En el caso de que se notifiquen varias actividades de tipo 1, deberá rellenarse este apartado y adjuntar un cuadro resumen en que se recojan todas las actividades, según el modelo que figura en el anexo).

1) Objetivo de la actividad:

Producción segura de virus infecciosos recombinantes del dengue (DENV) a partir de su genoma (cDNA clonado), con objeto de estudiar aspectos básicos de su biología, incluyendo los factores celulares y virales que regulan la infección por DENV en cultivo celular. Dicho genoma está basado en una cepa aislada de un paciente (cepa NGC, serotipo 2).

No se plantea modificar genéticamente ningún organismo, sino producir un virus recombinante para su uso confinado en tareas de investigación biomédica en cultivo celular. En concreto, se empleará un plásmido bacteriano (pDVWS601), previamente generado por otro laboratorio, que contiene la secuencia completa del genoma viral en un vector (pWSK29) que permite su transcripción in vitro para la producción de genomas virales completos en forma de RNA desnudo. Dicho material genético permitirá simular una infección viral mediante su introducción en células susceptibles que producirán el virus infeccioso recombinante. Por lo tanto, en esta propuesta se considerará el virus del dengue como organismo receptor que ha sido insertado en un plásmido bacteriano.

2) Duración prevista de la actividad:

Se prevé un periodo mínimo de 5 años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.

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

III. EVALUACIÓN DE RIESGO

(Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en el Anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo).

(En el caso de actividades de tipo 1 se incluirá en este apartado un listado de los principales organismos y material genético utilizados (organismos receptores, organismos donantes, insertos, vectores y organismos modificados genéticamente resultantes), así como la evaluación del riesgo para la salud humana y el medio ambiente de los mismos).

1) Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del:

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



a) Organismo receptor.

El DENV (cepa NGC; serotipo 2) es un flavivirus transmitido por mosquitos de la especie *Aedes* que infecta humanos.

b) Organismo donante.

NO APLICA

c) Inserto.

cDNA DEN-2 (NGC) acceso Genbank AF038403.1 descrito en Gualano et al. 1998 (PMID 9519821). Inclusión de mutaciones silenciosas para generar dianas únicas HpaI y MluI en nucleótidos 7404 (T→G) y 9732 (C→A) respectivamente. Descrito en Pryor et al. 2001 (PMID 11716094).

d) Vector.

El vector plasmídico empleado (pWSK29) contiene las secuencias mínimas para la propagación de los plásmidos en *E.coli* y conferir resistencia a ampicilina a las bacterias portadoras del plásmido. Contienen además los promotores de las ARN-polimerasas del fago T7 para permitir la transcripción del inserto in vitro. El ARN viral no se puede expresar en células de mamífero a partir del plásmido por lo que tiene que ser transcrito in vitro antes de ser introducido por transfección en las células diana.

e) Organismo modificado genéticamente resultante.

El organismo modificado genéticamente es un plásmido bacteriano (pDVWS601) que permite generar transcritos completos del genoma del virus del dengue infeccioso, distinguibles de los de la cepa original por introducción de mutaciones silenciosas. La introducción de dichos transcritos en células susceptibles permite la producción de virus del dengue recombinantes.

f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

El virus dengue se transmite entre las personas por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*, que se encuentran en todo el mundo. Los insectos que transmiten enfermedades son vectores.

La mayoría de las infecciones (80%) cursan con fiebre acompañada de dolores musculares y lesiones cutáneas tipo rash, sin complicaciones adicionales. En algunos casos (<5%), y especialmente en niños y jóvenes adultos, la infección puede evolucionar hacia fiebre hemorrágica o shock asociado a dengue. La fiebre hemorrágica asociada a dengue es también autoresuelta, aunque requiere tratamiento médico para la restitución de fluidos.

Los síntomas de infección usualmente comienzan de 4 a 7 días después de la picadura del mosquito y típicamente duran de 3 a 10 días. Para que ocurra la transmisión, el mosquito debe alimentarse de una persona durante un período de 5 días cuando hay grandes



cantidades de virus en la sangre; este período generalmente comienza un poco antes de que la persona se vuelva sintomática. Algunas personas nunca tienen síntomas importantes, pero aún pueden infectar a los mosquitos. Después de que el mosquito adquiera la infección por ingesta de sangre, el virus requerirá una incubación adicional de 8 a 12 días antes de que pueda transmitirse a otro ser humano. El mosquito permanece infectado el resto de su vida, que puede durar días o algunas semanas.

Ocasionalmente, el dengue se puede transmitir en trasplantes de órganos o transfusiones de sangre de donantes infectados, y hay evidencia de transmisión de una madre embarazada infectada a su feto. Pero en la gran mayoría de las infecciones, la picadura de un mosquito es responsable. De cualquier manera, la inoculación accidental percutánea constituye un riesgo potencial de infección.

g) Efectos para el medio ambiente.

No aplica.

2) Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

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

Tipo 1 ☐

Tipo 2 ☐

Tipo 3 ☒

Tipo 4 ☐

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

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

La actividad se 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 virus recombinante es prácticamente nulo debido a la ausencia de material punzante y cortante en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica y no hay riesgo de contagio por contacto.



b) Concentración y escala utilizadas.

La concentración de virus obtenida mediante las técnicas empleadas se encontrarán por debajo de 10^8 PFU/ml (unidades infecciosas por ml) con volúmenes máximos que no superarán los 50ml.

c) Condiciones de cultivo (se tendrá en cuenta el entorno potencialmente expuesto, la presencia de especies susceptibles, supervivencia del OMG y efectos sobre el entorno físico).

El rescate de virus recombinantes se realizará en células BHK21 empleando para su cultivo frascos con tapón de filtro o, en caso de emplear placas multipocillo, se emplearán contenedores secundarios con filtro, todo ello introducido en cajas resistentes a prueba de caída. Los experimentos de transfección y de infección 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:

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

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

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 Bioseguridad 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 bioseguridad. 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.

b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

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

c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.

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

d) Planes de emergencia.

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