MINISTERIO
DE AGRICULTURA Y PESCA,
ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

PARTE A

Tipos 2, 3 y 4

DIRECCION GENERAL DE
CALIDAD Y EVALUACION
AMBIENTAL Y MEDIO NATURAL

COMISIÓN NACIONAL DE
BIOSEGURIDAD

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

PLAZA DE SAN JUAN DE LA
CRUZ, S/N
28071 MADRID
TEL.: 91 597 56 50

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:

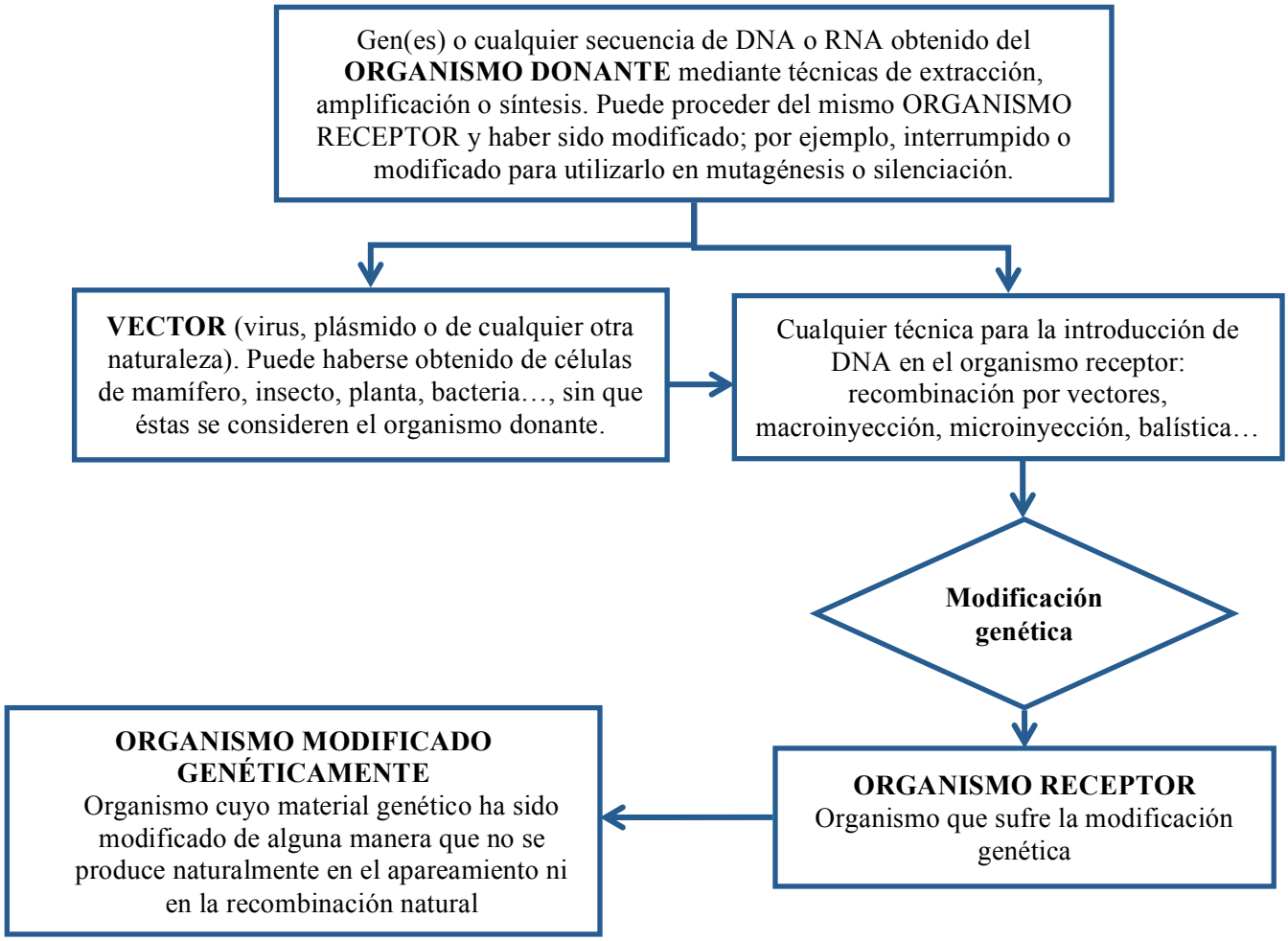
Producción segura de virus infecciosos recombinantes de la fiebre del Nilo Oriental (WNV) a partir de su genoma (cDNA clonado), con objeto de estudiar aspectos básicos de su biología, incluyendo los factores celulares y virales que regulan la infección por WNV en cultivo celular. Dicho genoma está basado en una cepa (NY99) aislada de un paciente.
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 plasmido bacteriano (pFLWNV), previamente generado por otro laboratorio, que contiene la secuencia completa del genoma viral en un vector (pBRlinker) 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 WNV como organismo receptor que ha sido insertado en un plásmido bacteriano.
La construcción plasmídica descrita aquí (pFLWNV) ha sido generada con anterioridad por Shi et al. (PMID 12021317) 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 de la fiebre del Nilo Occidental

Nombre común: virus de la fiebre del Nilo Occidental

Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

El WNV puede ser aislado de diversos tejidos de humanos y animales 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 organismo receptor

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 típica de virus de 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.

2) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Se han realizado las modificaciones genéticas silenciosas a efecto de marcador genético y tres cambios de nucleótidos fueron diseñados intencionalmente, dos para crear un sitio StyI (C a A y A a G en nt 8859 y 8862, respectivamente) y un tercero para noquear un sitio EcoRI (A a G en nt 8880). Estos sitios de restricción se pueden emplear como marcadores genéticos para distinguir el virus recombinante del virus parental. Descrito en Shi et al. 2002 (PMID 12021317). (ver punto 2c)

3) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

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:

El virus es potencialmente patogénico para humanos y animales como pájaros y algunos mamíferos salvajes. Infecta asintomáticamente a mosquitos. Existen modelos animales en ratón para la infección con WSN.

4) 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 de la fiebre del Nilo Oriental ha sido asignado al grupo de riesgo 3.

a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

La mayoría de las infecciones humanas son asintomáticas. En 1999, durante uno de los brotes recientes más importantes descritos en población humana, una encuesta reveló que solo el 20% de las personas seropositivas WNV en Nueva York reportaron síntomas consistentes con la fiebre WNV; aproximadamente la mitad había visitado a un médico en el momento de la enfermedad.

La mayoría de los casos clínicos de infecciones por WNV son leves y presentan síntomas parecidos a la gripe, que incluyen fiebre, dolor de cabeza y dolores en el cuerpo. También se observan debilidad, malestar, anorexia, linfadenopatía, náuseas y vómitos. En ocasiones se desarrolla una erupción cutánea maculopapular o morbiliforme eritematosa en el cuello, el tronco, los brazos o las piernas. La mayoría de las infecciones no complicadas se resuelven en 3-6 días.

En casos más severos, puede haber signos de encefalitis, meningoencefalitis o meningitis. Los síntomas pueden incluir fiebre alta, dolor de cabeza, rigidez en el cuello, estupor, desorientación, temblores, convulsiones, debilidad muscular severa, parálisis flácida y coma. También se han observado ataxia, anomalías del nervio craneal, mielitis, dolor ocular, polirradiculitis y convulsiones. En algunos brotes, ocurren miocarditis, pancreatitis y hepatitis fulminante. Se estima que 1 de 140 a 320 infecciones produce meningitis o encefalitis.

La tasa de letalidad en pacientes con enfermedad neuroinvasiva oscila entre el 4% y el 14%; puede alcanzar 15-29% en pacientes mayores de 70 años. Existe evidencia de que la enfermedad concurrente, como la diabetes o la inmunosupresión, aumenta el riesgo de muerte. Los pacientes gravemente enfermos pueden sufrir una morbilidad sustancial a largo plazo después de la recuperación; fatiga, pérdida de memoria, dificultad para caminar, debilidad muscular y depresión han sido reportados.

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

SI ☐ NO ☐

Porqué:

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

SÍ

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

El solicitante cuenta con más de 20 años de experiencia en manipulación de virus patógenos humanos en cultivo celular, incluyendo estudios de genética reversa y patogénesis, primero con el virus de la gripe y actualmente con el virus de la hepatitis C. El solicitante es autor de uno de los trabajos que permitió el desarrollo de un sistema de infección para el virus de la hepatitis C en cultivo celular basado en un virus recombinante. Dado que dicho virus es de la misma familia que el virus en cuestión y que su producción y manejo son semejantes, dicha experiencia es garantía de buenas prácticas. Cabe destacar que solicitante no trata de rescatar un virus nuevo, con propiedades desconocidas, sino el de recibir autorización para desarrollar actividades que se han desarrollado en otros laboratorios desde hace más de una década.

7) 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, pájaros salvajes y mamíferos salvajes.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No definido

8) 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 humanos, aves, mamíferos salvajes y mosquitos

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

Global

10) Hábitat natural del organismo:

Preferentemente zonas tropicales y subtropicales. Asociado a 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: No aplica

   a) Extracción ☐
   b) PCR ☐
   c) Síntesis *in Vitro* ☐

3) Función del gen/genes en el organismo donante:

   No aplica

4) ¿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

4) ¿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:

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 WNV de la cepa NY99 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 pBRlinker (ver más adelante) para dar lugar al vector pFLWNV, 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 pBRlinker, descrito en Shi et al. (PMID 12021317)

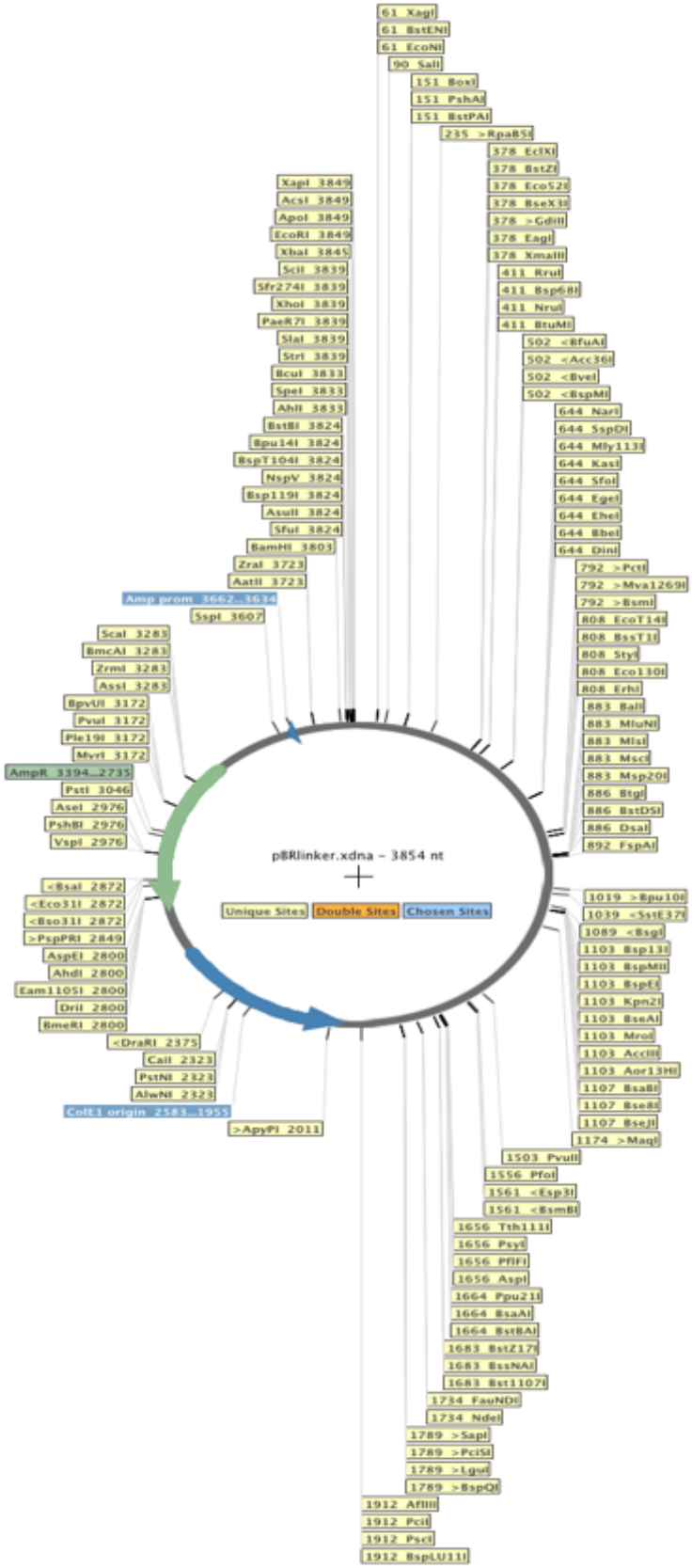
   b) Si se trata de un virus:

      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):*

      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 trascripción 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.

Restriction map of pBRlinker.xdna – 3854 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <Sep 12, 2018 4:39 PM>



d) Gama de hospedadores del vector:

E. coli

e) Características de la movilidad del vector:

factores de movilización: No codifica factores de movilización.

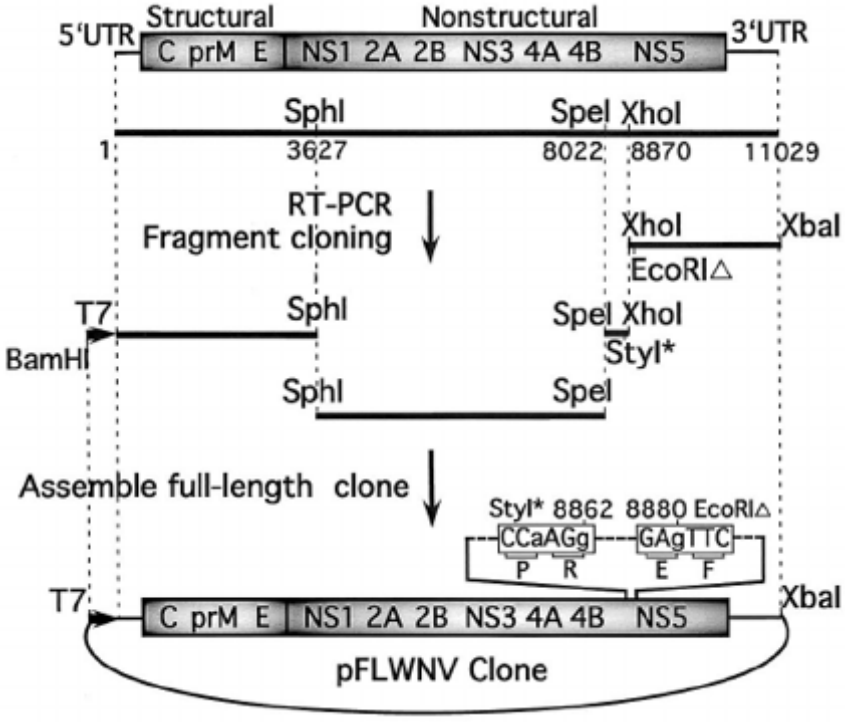
i) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas? No aplica

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

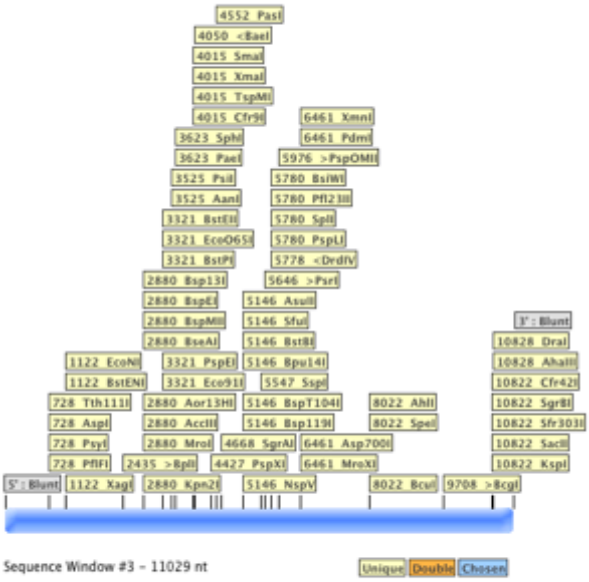
5) Información del inserto:

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

El inserto tiene 11029bp y corresponde al genoma de la cepa NY99 del WNS (GenBank KM083619.1)



Restriction map of Sequence Window #3 - 11029 nt
<Serial Cloner V2.5> -- <Aug 28, 2018 1:17 PM>



>KM083619.1 West Nile virus isolate NY99P2, complete genome
AGTAGTTCGCCTGTGTGAGCTGACAAACTTAGTAGTGTTTGTGAGGATTAACAACAATTAACACAGTGCG
AGCTGTTTCTTAGCACGAAGATCTCGATGTCTAAGAAACCAGGAGGGCCCGGCAAGAGCCGGGCTGTCAA
TATGCTAAAACGCGGAATGCCCCGCGTGTTGTCCTTGATTGGACTGAAGAGGGCTATGTTGAGCCTGATC
GACGGCAAGGGGCCAATACGATTTGTGTTGGCTCTCTTGGCGTTCTTCAGGTTCACAGCAATTGCTCCGA
CCCGAGCAGTGCTGGATCGATGGAGAGGTGTGAACAAACAAACAGCGATGAAACACCTTCTGAGTTTTAA
GAAGGAACTAGGGACCTTGACCAGTGCTATCAATCGGCGGAGCTCAAAACAAAAGAAAAGAGGAGGAAAG
ACCGGAATTGCAGTCATGATTGGCCTGATCGCCAGCGTAGGAGCAGTTACCCTCTCTAACTTCCAAGGGA
AGGTGATGATGACGGTAAATGCTACTGACGTCACAGATGTCATCACGATTCCAACAGCTGCTGGAAAGAA
CCTATGCATTGTCAGAGCAATGGATGTGGGATACATGTGCGATGATACTATCACTTATGAATGCCCAGTG
CTGTCGGCTGGTAATGATCCAGAAGACATCGACTGTTGGTGCACAAAGTCAGCAGTCTACGTCAGGTATG
GAAGATGCACCAAGACACGCCACTCAAGACGCAGTCGGAGGTCACTGACAGTGCAGACACACGGAGAAAG
CACTCTAGCGAACAAGAAGGGGGCTTGGATGGACAGCACCAAGGCCACAAGGTATTTGGTAAAAACAGAA
TCATGGATCTTGAGGAACCCTGGATATGCCCTGGTGGCAGCCGTCATTGGTTGGATGCTTGGGAGCAACA
CCATGCAGAGAGTTGTGTTTGTCGTGCTATTGCTTTTGGTGGCCCCAGCTTACAGCTTCAACTGCCTTGG
AATGAGCAACAGAGACTTCTTGGAAGGAGTGTCTGGAGCAACATGGGTGGATTTGGTTCTCGAAGGCGAC
AGCTGCGTGACTATCATGTCTAAGGACAAGCCTACCATCGATGTGAAGATGATGAATATGGAGGCGGCCA
ACCTGGCAGAGGTCCGCAGTTATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAGCTGCGTGCCC
GACCATGGGAGAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCAGCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGAC
AGGGGCTGGGGCAACGGCTGCGGACTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAATTTGCCTGCT
CTACCAAGGCAATAGGAAGAACCATCTTGAAAGAGAATATCAAGTACGAAGTGGCCATTTTTGTCCATGG
ACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAAACTACTCCACACAGGTTGGAGCCACTCAGGCAGGGAGATTCAGC
ATCACTCCTGCGGCGCCTTCATACACACTAAAGCTTGGAGAATATGGAGAGGTGACAGTGGACTGTGAAC
CACGGTCAGGGATTGACACCAATGCATACTACGTGATGACTGTTGGAACAAAGACGTTCTTGGTCCATCG
TGAGTGGTTCATGGACCTCAACCTCCCTTGGAGCAGTGCTGGAAGTACTGTGTGGAGGAACAGAGAGACG
TTAATGGAGTTTGAGGAACCACACGCCACGAAGCAGTCTGTGATAGCATTGGGCTCACAAGAGGGAGCTC
TGCATCAAGCTTTGGCTGGAGCCATTCCTGTGGAATTTTCAAGCAACACTGTCAAGTTGACGTCGGGTCA
TTTGAAGTGTAGAGTGAAGATGGAAAAATTGCAGTTGAAGGGAACAACCTATGGCGTCTGTTCAAAGGCT
TTCAAGTTTCTTGGGACTCCCGCAGACACAGGTCACGGCACTGTGGTGTTGGAATTGCAGTACACTGGCA
CGGATGGACCTTGCAAAGTTCCTATCTCGTCAGTGGCTTCATTGAACGACCTAACGCCAGTGGGCAGATT
GGTCACTGTCAACCCTTTTGTTTCAGTGGCCACGGCCAACGCTAAGGTCCTGATTGAATTGGAACCACCC
TTTGGAGACTCATACATAGTGGTGGGCAGAGGAGAACAACAGATCAATCACCATTGGCACAAGTCTGGAA
GCAGCATTGGCAAAGCCTTTACAACCACCCTCAAAGGAGCGCAGAGACTAGCCGCTCTAGGAGACACAGC
TTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGGGTGTTCACCTCAGTTGGGAAGGCTGTCCATCAAGTGTTCGGAGGA
GCATTCCGCTCACTGTTCGGAGGCATGTCCTGGATAACGCAAGGATTGCTGGGGGCTCTCCTGTTGTGGA
TGGGCATCAATGCTCGTGATAGGTCCATAGCTCTCACGTTTCTCGCAGTTGGAGGAGTTCTGCTCTTCCT
CTCCGTGAACGTGCACGCTGACACTGGGTGTGCCATAGACATCAGCCGGCAAGAGCTGAGATGTGGAAGT
GGAGTGTTCATACACAATGATGTGGAGGCTTGGATGGACCGGTACAAGTATTACCCTGAAACGCCACAAG

GCCTAGCCAAGATCATTCAGAAAGCTCATAAGGAAGGAGTGTGCGGTCTACGATCAGTTTCCAGACTGGA
GCATCAAATGTGGGAAGCAGTGAAGGACGAGCTGAACACTCTTTTGAAGGAGAATGGTGTGGACCTTAGT
GTCGTGGTTGAGAAACAGGAGGGAATGTACAAGTCAGCACCTAAACGCCTCACCGCCACCACGGAAAAAT
TGGAAATTGGCTGGAAGGCCTGGGGAAAGAGTATTTTATTTGCACCAGAACTCGCCAACAACACCTTTGT
GGTTGATGGTCCGGAGACCAAGGAATGTCCGACTCAGAATCGCGCTTGGAATAGCTTAGAAGTGGAGGAT
TTTGGATTTGGTCTCACCAGCACTCGGATGTTCCTGAAGGTCAGAGAGAGCAACACAACTGAATGTGACT
CGAAGATCATTGGAACGGCTGTCAAGAACAACTTGGCGATCCACAGTGACCTGTCCTATTGGATTGAAAG
CAGGCTCAATGATACGTGGAAGCTTGAAAGGGCAGTTCTGGGTGAAGTCAAATCATGTACGTGGCCTGAG
ACGCATACCTTGTGGGGCGATGGAATCCTTGAGAGTGACTTGATAATACCAGTCACACTGGCGGGACCAC
GAAGCAATCACAATCGGAGACCTGGGTACAAGACACAAAACCAGGGCCCATGGGACGAAGGCCGGGTAGA
GATTGACTTCGATTACTGCCCAGGAACTACGGTCACCCTGAGTGAGAGCTGCGGACACCGTGGACCTGCC
ACTCGCACCACCACAGAGAGCGGAAAGTTGATAACAGATTGGTGCTGCAGGAGCTGCACCTTACCACCAC
TGCGCTACCAAACTGACAGCGGCTGTTGGTATGGTATGGAGATCAGACCACAGAGACATGATGAAAAGAC
CCTCGTGCAGTCACAAGTGAATGCTTATAATGCTGATATGATTGACCCTTTTCAGTTGGGCCTTCTGGTC
GTGTTCTTGGCCACCCAGGAGGTCCTTCGCAAGAGGTGGACAGCCAAGATCAGCATGCCAGCTATACTGA
TTGCTCTGCTAGTCCTGGTGTTTGGGGGCATTACTTACACTGATGTGTTACGCTATGTCATCTTGGTGGG
GGCAGCTTTCGCAGAATCTAATTCGGGAGGAGACGTGGTACACTTGGCGCTCATGGCGACCTTCAAGATA
CAACCAGTGTTTATGGTGGCATCGTTTCTCAAAGCGAGATGGACCAACCAGGAGAACATTTTGTTGATGT
TGGCGGCTGTTTTCTTTCAAATGGCTTATCACGATGCCCGCCAAATTCTGCTCTGGGAGATCCCTGATGT
GTTGAATTCACTGGCGGTAGCTTGGATGATACTGAGAGCCATAACATTCACAACGACATCAAACGTGGTT
GTTCCGCTGCTAGCCCTGCTAACACCCGGGCTGAGATGCTTGAATCTGGATGTGTACAGGATACTGCTGT
TGATGGTCGGAATAGGCAGCTTGATCAGGGAGAAGAGGAGTGCAGCTGCAAAAAAGAAAGGAGCAAGTCT
GCTATGCTTGGCTCTAGCCTCAACAGGACTTTTCAACCCCATGATCCTTGCTGCTGGACTGATTGCATGT
GATCCCAACCGTAAACGCGGATGGCCCGCAACTGAAGTGATGACAGCTGTCGGCCTAATGTTTGCCATCG
TCGGAGGGCTGGCAGAGCTTGACATTGACTCCATGGCCATTCCAATGACTATCGCGGGGCTCATGTTTGC
TGCTTTCGTGATTTCTGGGAAATCAACAGATATGTGGATTGAGAGAACGGCGGACATTTCCTGGGAAAGT
GATGCAGAAATTACAGGCTCGAGCGAAAGAGTTGATGTGCGGCTTGATGATGATGGAAACTTCCAGCTCA
TGAATGATCCAGGAGCACCTTGGAAGATATGGATGCTCAGAATGGTCTGTCTCGCGATTAGTGCGTACAC
CCCCTGGGCAATCTTGCCCTCAGTAGTTGGATTTTGGATAACTCTCCAATACACAAAGAGAGGAGGCGTG
TTGTGGGACACTCCCTCACCAAAGGAGTACAAAAAGGGGGACACGACCACCGGCGTCTACAGGATCATGA
CTCGTGGGCTGCTCGGCAGTTATCAAGCAGGAGCGGGCGTGATGGTTGAAGGTGTTTTCCACACCCTTTG
GCATACAACAAAAGGAGCCGCTTTGATGAGCGGAGAGGGCCGCCTGGACCCATACTGGGGCAGTGTCAAG
GAGGATCGACTTTGTTACGGAGGACCCTGGAAATTGCAGCACAAGTGGAACGGGCAGGATGAGGTGCAGA
TGATTGTGGTGGAACCTGGCAAGAACGTTAAGAACGTCCAGACGAAACCAGGGGTGTTCAAAACACCTGA
AGGAGAAATCGGGGCCGTGACTTTGGACTTCCCCACTGGAACATCAGGCTCACCAATAGTGGACAAAAAC
GGTGATGTGATTGGGCTTTATGGCAATGGAGTCATAATGCCCAACGGCTCATACATAAGCGCGATAGTGC
AGGGTGAAAGGATGGATGAGCCAATCCCAGCCGGATTCGAACCTGAGATGCTGAGGAAAAAACAGATCAC
TGTACTGGATCTCCATCCCGGCGCCGGTAAAACAAGGAGGATTCTGCCACAGATCATCAAAGAGGCCATA
AACAGAAGACTGAGAACAGCCGTGCTAGCACCAACCAGGGTTGTGGCTGCTGAGATGGCTGAAGCACTGA
GAGGACTGCCCATCCGGTACCAGACATCCGCAGTGCCCAGAGAACATAATGGAAATGAGATTGTTGATGT
CATGTGTCATGCTACCCTCACCCACAGGCTGATGTCTCCTCACAGGGTGCCGAACTACAACCTGTTCGTG
ATGGATGAGGCTCATTTCACCGACCCAGCTAGCATTGCAGCAAGAGGTTACATTTCCACAAAGGTCGAGC
TAGGGGAGGCGGCGGCAATATTCATGACAGCCACCCCACCAGGCACTTCAGATCCATTCCCAGAGTCCAA
TTCACCAATTTCCGACTTACAGACTGAGATCCCGGATCGAGCTTGGAACTCTGGATACGAATGGATCACA
GAATACACCGGGAAGACGGTTTGGTTTGTGCCTAGTGTCAAGATGGGGAATGAGATTGCCCTTTGCCTAC
AACGTGCTGGAAAGAAAGTAGTCCAATTGAACAGAAAGTCGTACGAGACGGAGTACCCAAAATGTAAGAA
CGATGATTGGGACTTTGTTATCACAACAGACATATCTGAAATGGGGGCTAACTTCAAGGCGAGCAGGGTG
ATTGACAGCCGGAAGAGTGTGAAACCAACCATCATAACAGAAGGAGAAGGGAGAGTGATCCTGGGAGAAC
CATCTGCAGTGACAGCAGCTAGTGCCGCCCAGAGACGTGGACGTATCGGTAGAAATCCGTCGCAAGTTGG
TGATGAGTACTGTTATGGGGGGCACACGAATGAAGACGACTCGAACTTCGCCCATTGGACTGAGGCACGA
ATCATGCTGGACAACATCAACATGCCAAACGGACTGATCGCTCAATTCTACCAACCAGAGCGTGAGAAGG
TATATACCATGGATGGGGAATACCGGCTCAGAGGAGAAGAGAGAAAAAACTTTCTGGAACTGTTGAGGAC
TGCAGATCTGCCAGTTTGGCTGGCTTACAAGGTTGCAGCGGCTGGAGTGTCATACCACGACCGGAGGTGG
TGCTTTGATGGTCCTAGGACAAACACAATTTTAGAAGACAACAACGAAGTGGAAGTCATCACGAAGCTTG
GTGAAAGGAAGATTCTGAGGCCGCGCTGGATTGACGCCAGGGTGTACTCGGATCACCAGGCACTAAAGGC
GTTCAAGGACTTCGCCTCGGGAAAACGTTCTCAGATAGGGCTCATTGAGGTTCTGGGAAAGATGCCTGAG
CACTTCATGGGGAAGACATGGGAAGCACTTGACACCATGTACGTTGTGGCCACTGCAGAGAAAGGAGGAA
GAGCTCACAGAATGGCCCTGGAGGAACTGCCAGATGCTCTTCAGACAATTGCCTTGATTGCCTTATTGAG
TGTGATGACCATGGGAGTATTCTTCCTCCTCATGCAGCGGAAGGGCATTGGAAAGATAGGTTTGGGAGGC
GCTGTCTTGGGAGTCGCGACCTTTTTCTGTTGGATGGCTGAAGTTCCAGGAACGAAGATCGCCGGAATGT
TGCTGCTCTCCCTTCTCTTGATGATTGTGCTAATTCCTGAGCCAGAGAAGCAACGTTCGCAGACAGACAA
CCAGCTAGCCGTGTTCCTGATTTGTGTCATGACCCTTGTGAGCGCAGTGGCAGCCAACGAGATGGGTTGG
CTAGATAAGACCAAGAGTGACATAAGCAGTTTGTTTGGGCAAAGAATTGAGGTCAAGGAGAATTTCAGCA
TGGGAGAGTTTCTTTTGGACTTGAGGCCGGCAACAGCCTGGTCACTGTACGCTGTGACAACAGCGGTCCT
CACTCCACTGCTAAAGCATTTGATCACGTCAGATTACATCAACACCTCATTGACCTCAATAAACGTTCAG
GCAAGTGCACTATTCACACTCGCGCGAGGCTTCCCCTTCGTCGATGTTGGAGTGTCGGCTCTCCTGCTAG
CAGCCGGATGCTGGGGACAAGTCACCCTCACCGTTACGGTAACAGCGGCAACACTCCTTTTTTGCCACTA
TGCCTACATGGTTCCCGGTTGGCAAGCTGAGGCAATGCGCTCAGCCCAGCGGCGGACAGCGGCCGGAATC
ATGAAGAACGCTGTAGTGGATGGCATCGTGGCCACGGACGTCCCAGAATTAGAGCGCACCACACCCATCA
TGCAGAAGAAAGTTGGACAGATCATGCTGATCTTGGTGTCTCTAGCTGCAGTAGTAGTGAACCCGTCTGT
GAAGACAGTACGAGAAGCCGGAATTTTGATCACGGCCGCAGCGGTGACGCTTTGGGAGAATGGAGCAAGC
TCTGTTTGGAACGCAACAACTGCCATCGGACTCTGCCACATCATGCGTGGGGGTTGGTTGTCATGTCTAT
CCATAACATGGACACTCATAAAGAACATGGAAAAACCAGGACTAAAAAGAGGTGGGGCAAAAGGACGCAC

CTTGGGAGAGGTTTGGAAAGAAAGACTCAACCAGATGACAAAAGAAGAGTTCACTAGGTACCGCAAAGAG
GCCATCATCGAAGTCGATCGCTCAGCGGCAAAACACGCCAGGAAAGAAGGCAATGTCACTGGAGGGCATC
CAGTCTCTAGGGGCACAGCAAAACTGAGATGGCTGGTCGAACGGAGGTTTCTCGAACCGGTCGGAAAAGT
GATTGACCTTGGATGTGGAAGAGGCGGTTGGTGTTACTATATGGCAACCCAAAAAAGAGTCCAAGAAGTC
AGAGGGTACACAAAGGGCGGTCCCGGACATGAAGAGCCCCAACTAGTGCAAAGTTATGGATGGAACATTG
TCACCATGAAGAGTGGAGTGGATGTGTTCTACAGACCTTCTGAGTGTTGTGACACCCTCCTTTGTGACAT
CGGAGAGTCCTCGTCAAGTGCTGAGGTTGAAGAGCATAGGACGATTCGGGTCCTTGAAATGGTTGAGGAC
TGGCTGCACCGAGGGCCAAGGGAATTTTGCGTGAAGGTGCTCTGCCCCTACATGCCGAAAGTCATAGAGA
AGATGGAGCTGCTCCAACGCCGGTATGGGGGGGGACTGGTCAGAAACCCACTCTCACGGAATTCCACGCA
CGAGATGTATTGGGTGAGTCGAGCTTCAGGCAATGTGGTACATTCAGTGAATATGACCAGCCAGGTGCTC
CTAGGAAGAATGGAAAAAAGGACCTGGAAGGGACCCCAATACGAGGAAGATGTAAACTTGGGAAGTGGAA
CCAGGGCGGTGGGAAAACCCCTGCTCAACTCAGACACCAGTAAAATCAAGAACAGGATTGAACGACTCAG
GCGTGAGTACAGTTCGACGTGGCACCACGATGAGAACCACCCATATAGAACCTGGAACTATCACGGCAGT
TATGATGTGAAGCCCACAGGCTCCGCCAGTTCGCTGGTCAATGGAGTGGTCAGGCTCCTCTCAAAACCAT
GGGACACCATCACGAATGTTACCACCATGGCCATGACTGACACTACTCCCTTCGGGCAGCAGCGAGTGTT
CAAAGAGAAGGTGGACACGAAAGCTCCTGAACCGCCAGAAGGAGTGAAGTACGTGCTCAATGAGACCACC
AACTGGTTGTGGGCGTTTTTGGCCAGAGAAAAACGTCCCAGAATGTGCTCTCGAGAGGAATTCATAAGAA
AGGTCAACAGCAATGCAGCTTTGGGTGCCATGTTTGAAGAGCAGAATCAATGGAGGAGCGCCAGAGAAGC
AGTTGAAGATCCAAAATTTTGGGAGATGGTGGATGAGGAGCGCGAGGCACATCTGCGGGGGGAATGTCAC
ACTTGCATTTACAACATGATGGGAAAGAGAGAGAAAAAACCCGGAGAGTTCGGAAAGGCCAAGGGAAGCA
GAGCCATTTGGTTCATGTGGCTCGGAGCTCGCTTTCTGGAGTTCGAGGCTCTGGGTTTTCTCAATGAAGA
CCACTGGCTTGGAAGAAAGAACTCAGGAGGAGGTGTCGAGGGCTTGGGCCTCCAAAAACTGGGTTACATC
CTGCGTGAAGTTGGCACCCGGCCTGGGGGCAAGATCTATGCTGATGACACAGCTGGCTGGGACACCCGCA
TCACGAGAGCTGACTTGGAAAATGAAGCTAAGGTGCTTGAGCTGCTTGATGGGGAACATCGGCGTCTTGC
CAGGGCCATCATTGAGCTCACCTATCGTCACAAAGTTGTGAAAGTGATGCGCCCGGCTGCTGATGGAAGA
ACCGTCATGGATGTTATCTCCAGAGAAGATCAGAGGGGGAGTGGACAAGTTGTCACCTACGCCCTAAACA
CTTTCACCAACCTGGCCGTCCAGCTGGTGAGGATGATGGAAGGGGAAGGAGTGATTGGCCCAGATGATGT
GGAGAAACTCACAAAAGGGAAAGGACCCAAAGTCAGGACCTGGCTGTTTGAGAATGGGGAAGAAAGACTC
AGCCGCATGGCTGTCAGTGGAGATGACTGTGTGGTAAAGCCCCTGGACGATCGCTTTGCCACCTCGCTCC
ACTTCCTCAATGCTATGTCAAAGGTTCGCAAAGACATCCAAGAGTGGAAACCGTCAACTGGATGGTATGA
TTGGCAGCAGGTTCCATTTTGCTCAAACCATTTCACTGAATTGATCATGAAAGATGGAAGAACACTGGTG
GTTCCATGCCGAGGACAGGATGAATTGGTAGGCAGAGCTCGCATATCTCCAGGGGCCGGATGGAACGTCC
GCGACACTGCTTGTCTGGCTAAGTCTTATGCCCAGATGTGGCTGCTTCTGTACTTCCACAGAAGAGACCT
GCGGCTCATGGCCAACGCCATTTGCTCCGCTGTCCCTGTGAATTGGGTCCCTACCGGAAGAACCACGTGG
TCCATCCATGCAGGAGGAGAGTGGATGACAACAGAGGACATGTTGGAGGTCTGGAACCGTGTTTGGATAG
AGGAGAATGAATGGATGGAAGACAAAACCCCAGTGGAGAAATGGAGTGACGTCCCATATTCAGGAAAACG
AGAGGACATCTGGTGTGGCAGCCTGATTGGCACAAGAGCCCGAGCCACGTGGGCAGAAAACATCCAGGTG
GCTATCAACCAAGTCAGAGCAATCATCGGAGATGAGAAGTATGTGGATTACATGAGTTCACTAAAGAGAT
ATGAAGACACAACTTTGGTTGAGGACACAGTACTGTAGATATTTAATCAATTGTAAATAGACAATATAAG
TATGCATAAAAGTGTAGTTTTATAGTAGTATTTAGTGGTGTTAGTGTAAATAGTTAAGAAAATTTTGAGG
AGAAAGTCAGGCCGGGAAGTTCCCGCCACCGGAAGTTGAGTAGACGGTGCTGCCTGCGACTCAACCCCAG
GAGGACTGGGTGAACAAAGCCGCGAAGTGATCCATGTAAGCCCTCAGAACCGTCTCGGAAGGAGGACCCC
ACATGTTGTAACTTCAAAGCCCAATGTCAGACCACGCTACGGCGTGCTACTCTGCGGAGAGTGCAGTCTG
CGATAGTGCCCCAGGAGGACTGGGTTAACAAAGGCAAACCAACGCCCCACGCGGCCCTAGCCCCGGTAAT
GGTGTTAACCAGGGCGAAAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCGCGGTTTAAAGTGCACGGCCCAGCCTG
ACTGAAGCTGTAGGTCAGGGGAAGGACTAGAGGTTAGTGGAGACCCCGTGCCACAAAACACCACAACAAA
ACAGCATATTGACACCTGGGATAGACTAGGAGATCTTCTGCTCTGCACAACCAGCCACACGGCACAGTGC
GCCGACAATGGTGGCTGGTGGTGCGAGAACACAGGATCT

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

El inserto tiene 11029bp y corresponde al genoma de la cepa NY99 del WNS (GenBank KM083619.1). Contiene un único marco de lectura abierto y dos regiones no traducidas flanqueantes que tienen por función sostener la traducción y la replicación viral.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Transcripción inversa y PCR de fragmentos. Clonaje molecular mediante enzima de restricción en vectores plasmídicos intermedios.

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

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

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

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

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

SI

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.

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? SI

      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:

   El análisis de secuencia del clon de ADNc de longitud completa muestra 11 cambios de nucleótidos en comparación con la secuencia del virus parental. Todos los cambios de nucleótidos fueron mutaciones silenciosas, excepto una transición de T a C en nt 7826, que dio como resultado un cambio de un residuo de valina a un residuo de alanina. Tres cambios de nucleótidos fueron diseñados intencionalmente, dos para crear un sitio StyI (C a A y A a G en nt 8859 y 8862, respectivamente) y un tercero para noquear un sitio EcoRI (A a G en nt 8880). Estos sitios de restricción se pueden emplear usaron como marcadores genéticos para distinguir el virus recombinante del virus parental. Descrito en Shi et al. 2002 (PMID 12021317). Fenotípicamente indistinguible del virus original.

   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: No aplica

f) Marcadores específicos del OMG:

Tres cambios de nucleótidos fueron diseñados intencionalmente, dos para crear un sitio StyI (C a A y A a G en nt 8859 y 8862, respectivamente) y un tercero para noquear un sitio EcoRI (A a G en nt 8880). Estos sitios de restricción se pueden emplear como marcadores genéticos para distinguir el virus recombinante del virus parental.

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:

a) 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.

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

El WNV puede ser aislado de individuos 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 de la fiebre del Nilo Oriental (WNV) 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 WNV en cultivo celular. Dichos genomas están basados en cepas aisladas de individuos infectados que han sido alteradas genéticamente para adaptarlos a cultivo celular.

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:

No se ha enviado el OMG, sino su precursor en forma de ADN plasmídico. El plásmido pFLWNV descrito en Shi et al 2002 (PMID 12021317) ha sido cedido por el Dr. Shi (NIH, USA) 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 aplicable[1] *(tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado)*:

[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) nº** 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) nº 1255/97**.**

NO APLICA

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 producirán virus infeccioso de la cepa prototípica WNV NY99 (AF404756) usando transcritos de ARN in vitro preparados a partir del plásmido infeccioso pFLWNV linealizado con XbaI y utilizando el kit mMESSAGE mMACHINE T7 (Ambion). Se emplearán 5 µg de ARN transcrito in vitro para transfectar $4x10^6$ células HEK293T mediante transfección con Lipofectamine 2000. 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 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% formaldehido-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 exclusa 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 volúmen (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 CO_2. Una vez propagado el virus a toda el cultivo (determinado por el efecto citopático del mismo), serán recogidos 3 días después de la infección y filtrados (0.45 µm, Corning). Se esperan títulos máximos que no superarán 10^8 pfu/ml.

El rescate del virus se realizará en el P3 del CNB donde se utilizarán equipos de protección individual. Como es preceptivo, todos los residuos biosanitarios generados se inactivarán en un primer paso en el interior de la cabina de flujo laminar. Posteriormente volverán a ser inactivados mediante autoclave (residuos sólidos) o en la planta de inactivación de efluentes líquidos del laboratorio (residuos líquidos). El investigador responsable del proyecto y encargado de su ejecución ha recibido cursos de formación en bioseguridad y de nivel 3 de contención biológica en el CNB, y ha trabajado con virus de nivel de contención 3 (hepatitits C recombinante) a lo largo de mas de 13 años. Se seguirán todos los procesos preceptivos, tales como no sacar los brazos de la cabina de trabajo sin desinfectarlos, desinfectar cualquier objeto que esté en el interior de la cabina y esperar diez minutos antes de sacarlo. Todos los investigadores que trabajen regularmente en el P3 con el WNV, guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier animalario de experimentación animal. Ninguna persona embarazada estará expuesta al virus.

- **Reglamento (CE) nº** 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/

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. GESTION 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

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.

PLAZA DE SAN JUAN DE LA
CRUZ, S/N
28071 MADRID
TEL.: 91 597 56 50

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 de la fiebre del Nilo Occidental (WNV) 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 WNV en cultivo celular. Dicho genoma está basado en una cepa (NY99) aislada de un paciente.
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 plasmido bacteriano (pFLWNV), previamente generado por otro laboratorio, que contiene la secuencia completa del genoma viral en un vector (pBRlinker) 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 WNV como organismo receptor que ha sido insertado en un plásmido bacteriano.
La construcción plasmídica descrita aquí (pFLWNV) ha sido generada con anterioridad por Shi et al. (PMID 12021317) y han sido empleadas para rescatar virus recombinantes en diversos laboratorios NCB3 en el mundo.

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 WNV 3356 (NY99; linaje I) es un flavivirus transmitido por mosquitos que infectan humanos: se trata de las secuencias obtenidas a partir de un aislado de campo. En particular, del riñon de un cuervo infectado durante el brote en Nueva York en el año 1999.

b) Organismo donante. NO APLICA

c) Inserto.

WNV 3356 (NY99; linaje I): El inserto consiste en el genoma completo de WNV de la cepa WNV 3356 (serotipo 2). Contiene todos los elementos estructurales y funcionales para la producción de viriones infecciosos. Tiene por lo tanto un potencial semejante al descrito para el "organismo receptor". El análisis de secuencia del clon de ADNc de longitud completa muestra 11 cambios de nucleótidos en comparación con la secuencia del virus parental. Todos los cambios de nucleótidos fueron mutaciones silenciosas, excepto una transición de T a C en nt 7826, que dio como resultado un cambio de un residuo de valina a un residuo de alanina. Tres cambios de nucleótidos fueron diseñados intencionalmente, dos para crear un sitio StyI (C a A y A a G en nt 8859 y 8862, respectivamente) y un tercero para noquear un sitio EcoRI (A a G en nt 8880). Estos sitios de restricción se pueden emplear usaron como marcadores genéticos para distinguir el virus recombinante del virus parental. Descrito en Shi et al. 2002 (PMID 12021317).

d) Vector.

Los vectores empleados contienen las secuencias mínimas para la propagación de los plásmidos en E.coli y conferir resistencia a ampicilina a las bacterias portadoras del plásmido.

El plásmido pBRlinker (Shi et al. 2002) en el que se ha clonado WNV NY99 contiene además el promotor de la ARN-polimerasas del fago T7 para permitir la trascripción 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 plásmido resultante de introducir el genoma completo de WNV en el pBRlinker (pFLWNV). No tiene propiedades nocivas per se, a no ser que se sigan los procedimientos de transcripción in vitro y transfección de los genomas resultantes en células susceptibles.

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

El virus del Nilo Occidental se transmite más comúnmente a las personas por la picadura de un mosquito infectado. Los mosquitos se infectan cuando se alimentan de aves infectadas. Los mosquitos infectados luego propagan el virus del Nilo Occidental a las personas y otros animales al morderlos. En un número muy pequeño de casos, el virus del Nilo Occidental se ha diseminado a través de:

Exposición en un entorno de laboratorio

Transfusión de sangre y donación de órganos

Madre a bebé, durante el embarazo, el parto o la lactancia

Sin síntomas en la mayoría de las personas. La mayoría de las personas (8 de cada 10) infectadas con el virus del Nilo Occidental no desarrollan ningún síntoma.

Enfermedad febril (fiebre) en algunas personas. Aproximadamente 1 de cada 5 personas infectadas desarrollan fiebre con otros síntomas como dolor de cabeza, dolores en el cuerpo, articulaciones, vómitos, diarrea o sarpullido. La mayoría de las personas con este tipo de enfermedad del virus del Nilo Occidental se recuperan por completo, pero la fatiga y la debilidad pueden durar semanas o meses.

Síntomas graves en algunas personas. Aproximadamente 1 de cada 150 personas que están infectadas desarrollan una enfermedad grave que afecta el sistema nervioso central, como la encefalitis (inflamación del cerebro) o la meningitis (inflamación de las membranas que rodean el cerebro y la médula espinal).

Los síntomas de una enfermedad grave incluyen fiebre alta, dolor de cabeza, rigidez en el cuello, estupor, desorientación, coma, temblores, convulsiones, debilidad muscular, pérdida de visión, entumecimiento y parálisis.

Una enfermedad grave puede ocurrir en personas de cualquier edad; Sin embargo, las personas mayores de 60 años corren un mayor riesgo. Las personas con ciertas afecciones médicas, como cáncer, diabetes, hipertensión, enfermedad renal y personas que han recibido trasplantes de órganos, también corren un mayor riesgo.

La recuperación de una enfermedad grave puede demorar varias semanas o meses. Algunos efectos en el sistema nervioso central pueden ser permanentes. Aproximadamente 1 de cada 10 personas que desarrollan una enfermedad grave que afecta el sistema nervioso central muere.

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 10^7 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 HEK293T 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 en células Huh-7 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