



**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 (CNB). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Dirección postal: Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Darwin 3. Campus Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid.

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Mario Mellado García

NIF: 13295208N

Cargo: Director del CNB

Tel: 91 585 45 03 / 4852

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: direccion.cnb@csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Luis Enjuanes Sánchez

NIF: 19418297-H

Cargo: Profesor Investigación CSIC

Tel: 91 585 45 55

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: l.enjuanes@cnb.csic.es



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

Nombre y apellidos: Gonzalo Pascual Alvarez

NIF: 05251912T

Cargo: Jefe del Servicio de Seguridad Biológica

Tel: 916202300

Fax: 916202247

Correo electrónico: gpascual@inia.es

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

Nombre y apellidos: Fernando Usera Mena

NIF: 00694865-N

Cargo: Responsable del Servicio de Bioseguridad del CNB

Tel: 91 585 45 41

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es

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

Si la respuesta a la pregunta anterior es **SI**, debe justificarlo especificando¹:

-Nombre de la convocatoria: Proyectos I+D+i

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

BIO2016-75549-R. "Bases moleculares de la virulencia de coronavirus respiratorios humanos y diseño de vacunas y estrategias antivirales para proteger a pacientes jóvenes y mayores". 2017-2019. IPs: Isabel Sola and Luis Enjuanes.

Organismo financiador: MINECO

¹TASAS

Están exentos del pago de la tasa los casos en los que se cumplan dos requisitos, que la actividad se realice en el marco de los Planes Estatales de Investigación Científica y Técnica y de Innovación; y que se desarrolle por una institución, ente u órgano público.



- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

Proyecto intramural PID2019-107001RB-100.

IPs: Isabel Sola y Luis Enjuanes

Organismo financiador: Ministerio de Ciencia e Innovación, Agencia Estatal de Investigación

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

Proyecto Intramural Especial CSIC-VICIT (Ref 202020E043). 2020-2023

IPs: Luis Enjuanes and Isabel Sola. 2020-2023

Organismo financiador: CSIC

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:

Fecha de comunicación: 18/02/2000

Autorización: A/ES/00/I-1

b) Número de referencia del expediente:

Fecha: 4.12.00

Registro salida: 8443

Fecha: 5 diciembre de 2000

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

El objetivo de la actividad es el diseño de vacunas y la selección de antivirales para proteger frente a la infección respiratoria causada por el coronavirus SARS-CoV. Para ello se realizarán ensayos de patogenicidad y protección en ratones convencionales Balb/c, susceptibles a la infección viral, que mimetizan la enfermedad pulmonar severa observada en humanos. La eficacia de los candidatos vacunales o antivirales se determinará en el modelo animal murino. Para conseguir estos objetivos, el único modelo experimental que se puede utilizar son animales y particularmente ratones.

El modelo animal consiste en ratones convencionales Balb/c de 16 semanas de edad adquiridos a laboratorios Jackson.



Los virus utilizados en los ensayos de patogenicidad y protección son virus recombinantes basados en el genoma del coronavirus SARS-CoV cepa Urbani aislado en 2003 de pacientes con enfermedad respiratoria grave durante la epidemia que se inició en la Provincia china de Guangdong. La construcción de estos recombinantes, realizada en la instalación ya autorizada con número de notificación: A/ES/00/I-08, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), ha sido aprobada por la Comisión Nacional de Bioseguridad (Número de Notificación A/ES/06/16 y A/ES/06/12).

Las diferentes formas de virus SARS-CoV recombinante, con el genoma completo o con deleciones en diferentes genes, se rescatarán a partir de un cromosoma artificial de bacterias (BAC) que crece en *E. coli*, que codifica el cDNA del virus. El genoma completo del virus solo presenta dos mutaciones silenciosas que se han introducido como marcadores genéticos. Además, se construirán mutantes de este coronavirus en los que se delecionarán o modificarán los genes específicos de género 3a, 3b, E, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, y 9b y el gen estructural E, solos o en distintas combinaciones. Estos virus rSARS-CoV se rescatarán en células de mamífero a partir de cromosomas artificiales de bacterias que codifican los distintos virus. Los virus rSARS-CoV con mutaciones en sus proteínas se comportarán en general como virus atenuados, con menor o igual tasa de replicación y menor patogenicidad que el organismo parental. Así mismo, se pretender generar virus eficientes en replicación y defectivos en propagación, lo que confiere un grado adicional de atenuación a los OMGs generados. La construcción de estos mutantes de deleción, realizada en la instalación ya autorizada A/ES/00/I-08, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), ha sido aprobada por la Comisión Nacional de Bioseguridad (Números de Notificación: A/ES/06/16 y A/ES/06/12). **El objetivo final es generar virus atenuados que puedan servir como vacunas seguras.**

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

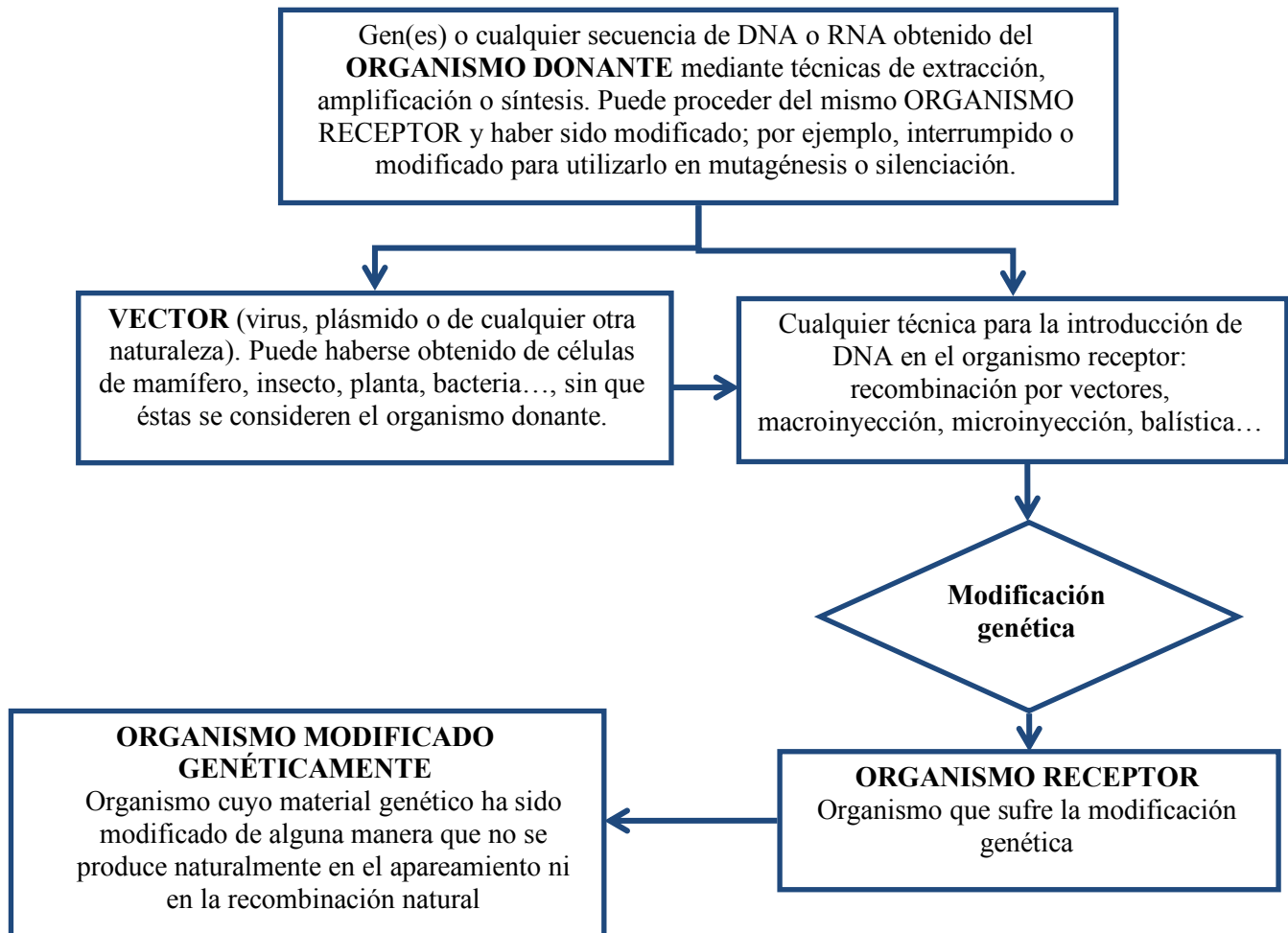
Tipo 2

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: Virus recombinante SARS-CoV (rSARS-CoV)

Taxonomía: perteneciente a la Familia *Coronaviridae*, género *Betacoronavirus*, subgénero *Sarbecovirus*

Nombre común: recombinante del coronavirus causante del síndrome respiratorio agudo y grave (SARS-CoV).

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

El virus rSARS-CoV se obtendrá a partir de un clon (cDNA) infeccioso. Éste cDNA codificará el genoma del virus SARS-CoV cepa Urbani (referencia GenBank: AY278741), con dos mutaciones silenciosas en los nt 10338 (C por T) y 11163 (T por A) como marcadores genéticos. Para su obtención se clonarán secuencialmente 5 fragmentos de DNA obtenidos por RT-PCR a partir de RNA total de células infectadas con SARS-CoV procedentes del CDC Atlanta (USA) utilizando oligonucleótidos específicos. El cDNA se mantendrá en un cromosoma artificial de bacterias (BAC), que se utilizará como vector y se amplificará en una cepa de bacterias *Escherichia coli* no patógena. La última etapa del clonaje y el rescate del virus se realizará en el laboratorio NCB3 del CNB-CSIC. Para aislar el virus rSARS-CoV se transfectarán células Vero E6 con el cDNA generado. Este procedimiento se realizará en frascos de cultivos cerrados. A las 48 -72 horas post-transfección (hpt) se recogerá el medio de cultivo que contendrá el rSARS-CoV.

Las secuencias del BAC (pBeloBac11.pdf) y del inserto que codifica el rSARS-CoV (SARSCoV.pdf), así como las secuencias de los 5 fragmentos (F1.pdf, F2.pdf, F3.pdf, F4.pdf y F5.pdf) se adjuntaron en la solicitud de la que ya se tiene autorización con número de notificación: A/ES/06/16 y A/ES/06/12.

b) Técnicas de identificación:

Para la identificación del rSARS-CoV se amplificará su genoma mediante RT-PCR y se procederá a secuenciar completamente el genoma viral. De este modo, se comprobará que su secuencia coincide con la codificada por el cDNA infeccioso, incluyendo los dos marcadores genéticos que distinguen este virus recombinante de cualquier SARS-CoV-aislado de pacientes.

c) Marcadores genéticos:

Se han introducidos dos marcadores genéticos que consisten en dos mutaciones silenciosas en los nt 10338 (C por T) y 11163 (T por A).



d) Marcadores fenotípicos:

No aplica

e) Estabilidad genética:

La estabilidad genética del virus recombinante rSARS-CoV es elevada. No se han descrito variaciones de secuencia debido al crecimiento de este tipo de virus en cultivos celulares. Además, se darán pocos pasos una vez rescatado el rSARS-CoV a partir del cDNA infectivo.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Dos mutaciones silenciosas en los nt 10338 y 11163 como marcadores genéticos. No hay ninguna modificación genética no deseada que se encuentre con anterioridad.

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI NO

El rSARS-CoV será idéntico al virus silvestre SARS-CoV aislado de pacientes, excepto en los dos marcadores genéticos. Por tanto, se espera que sea patógeno para humanos, dado que el virus silvestre (SARS-CoV) produce enfermedad respiratoria severa en humanos.

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 rSARS-CoV será patógeno para humanos.

Con la información disponible, se considera que el origen del virus silvestre (SARS-CoV) es el murciélago y que las civetas actuaron como animal hospedador intermedio. Los coronavirus SARS-CoV y MERS-CoV, aunque son virus patógenos para humanos, no causan enfermedad en los animales hospedadores intermedios.

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 organismo receptor rSARS-CoV, patógeno para humanos, se clasifica como nivel 3.

a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

Se espera que la patogenicidad del rSARS-CoV sea idéntica a la del virus SARS-CoV-silvestre, causando infección respiratoria severa que puede llegar a ser mortal en promedio



en el 10% de los individuos infectados, aunque la mortalidad es muy dependiente de la edad. Los síntomas clínicos de la infección serían fiebre, tos y dificultad respiratoria con signos de neumonía.

- 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?

Las células Vero E6, en las que se propaga el rSARS-CoV-2019, están libres de agentes biológicos contaminantes.

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

El trabajo con virus similares (SARS-CoV, MERS-CoV) que resultan letales para humanos, se realiza en todo el mundo (EEUU, Europa, China) en laboratorios de contención biológica NCB3, bajo condiciones y protocolos inferiores a los que utilizamos en el NCB3 del CNB, tal como certificó el equipo del NIH-CDC que inspeccionó las instalaciones y protocolos implementados en el CNB-CSIC. Nuestro grupo ha estado trabajando mas de 17 años con SARS-CoV y, desde el año 2013, se trabaja con otro coronavirus humano que causa enfermedad respiratoria grave (MERS-CoV), en las instalaciones NCB3 del CNB, sin ningún problema. En este momento seis investigadores del laboratorio 114 trabajan regularmente con estos virus. Todos los investigadores que trabajen regularmente en el P3 con el SARS-CoV guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier animalario de experimentación animal, al igual que hacen cuando trabajan con SARS-CoV-2 o con MERS-CoV. Todos los protocolos e instalaciones utilizados por nuestro grupo son superiores a las que se utilizan en los países indicados, incluyendo los laboratorios del NIH, tanto pertenecientes al NIAID, como los del nuevo edificio de Biodefensa en Bethesda (EEUU) hemos visitado. Los protocolos e instalaciones utilizadas se han contrastado con visitas a laboratorios de Alemania, Italia, Holanda y EEUU. Recientemente, después de una inspección exhaustiva, tanto las instalaciones como los protocolos de actuación han sido aprobados por el NIH-CDC. Consideramos que nuestro centro y nuestros equipos están preparados para realizar este trabajo que hemos ejecutado durante 17 años en el CNB.

- 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?:



Para sobrevivir el virus rSARS-CoV necesita de la maquinaria de la célula infectada. Por tanto, su capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivos será muy limitada. Se ha determinado que el virus rSARS-CoV podría sobrevivir 24 – 48 h fuera de la célula.

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:

La exposición a temperaturas iguales o mayores a 37°C, a luz ultravioleta, o a agentes químicos reduce drásticamente la capacidad de supervivencia del rSARS-CoV fuera de las condiciones de cultivo.

d) Posibles nichos ecológicos:

El virus rSARS-CoV no se encuentra en la naturaleza, dado que se obtendrá en el laboratorio a partir del cDNA infectivo.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

El virus rSARS-CoV no se encuentra en el medio ambiente.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

El virus rSARS-CoV no interacciona con otros organismos ya que está confinado en el laboratorio NCB3 y es poco probable que salga de él ya que es incapaz de propagarse fuera de un cultivo celular.



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

El virus rSARS-CoV con el que se va a trabajar no se encuentra en la naturaleza ya que ha sido generado en el laboratorio.

12) Hábitat natural del organismo:

El virus rSARS-CoV con el que se va a trabajar no se encuentra en la naturaleza ya que ha sido generado en el laboratorio.

El virus silvestre SARS-CoV circuló en la población humana durante el brote iniciado en China en noviembre de 2002, que la OMS declaró terminado en agosto de 2003. En esta epidemia, SARS-CoV infectó 8422 personas y causó la muerte de unas 800. Desde entonces, no se ha detectado la circulación del virus SARS-CoV en la población humana.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: No aplica

Taxonomía:

Nombre común:

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in Vitro*

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

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

SI NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i) seres humanos

ii) animales

iii) plantas

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?



- c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?
- 6) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

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:

Eliminación de genes de rSARS-CoV para estudiar el papel de estos genes en la interacción con el hospedador y virulencia de dicho virus. En el caso de la proteína estructural E, también se podrán realizar mutaciones que eliminen motivos que se conoce que están implicados en la virulencia, siguiendo estrategias similares a las que se han utilizado previamente en nuestro laboratorio (Nieto-Torres J.L. et al, 2014, PLoS Pathog. 10:e1004077; Jimenez-Guardeño J.M. et al, 2014, PLoS Pathog. 10:e1004320). Se obtendrán distintos clones de BACs que contengan uno o varios genes virales modificados, a partir de los cuales se rescatarán virus defectivos. **El objetivo final es generar virus atenuados que puedan servir como vacunas seguras.**

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

Para generar el clon infectivo que codifica el virus rSARS-CoV, se partirá de fragmentos de cDNA sintetizados por RT-PCR. Estos fragmentos, se insertarán en el BAC disponible en el laboratorio (pBeloBac11.pdf), mediante técnicas de clonaje convencionales que consisten en el uso de enzimas de restricción adecuadas y posterior ligación de los fragmentos de DNA.

Partiendo de este BAC que codifica el virus rSARS-CoV completo, se delecionarán o modificarán los genes 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b y E mediante técnicas de clonaje convencionales.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:



a) Tipo e identidad del vector:

Cromosoma artificial de bacterias (BAC), en concreto el pBeloBac11.

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*):

Ver documentos adjuntos pBeloBAC_map.pdf y pBeloBac.pdf, que contienen toda la información solicitada. Se enviaron en la notificación con número: A/ES/20/16

d) Gama de hospedadores del vector:

Bacterias *Escherichia coli*.

e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización:

No presenta

ii) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?

No aplica

iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?

No aplica porque el BAC siempre se utilizará en bacterias.

5) Información del inserto:

Las modificaciones en el organismo receptor se realizarán generando cDNAs infectivos, mantenidos en cromosomas artificiales de bacterias (BACs), que contengan deleciones o modificaciones en los genes 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b y E. Los DNAs mutantes se generan por técnicas de clonaje convencionales. Posteriormente se sustituirá el correspondiente fragmento del cDNA infectivo por los genes delecionados o mutados.

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

Las secuencias de los mutantes de deleción individual de los genes E, 3 y 8a y las de las deleciones conjuntas [6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b] y [E, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b], así como las mutaciones que eliminan la funcionalidad del dominio PBM de virulencia y de la actividad canal iónico de la proteína E se adjuntaron en la solicitud de la que ya se tiene autorización con número de notificación: A/ES/06/16 y A/ES/06/12.



b) Origen y función específica de cada parte del inserto

Los insertos mutantes se han sintetizado químicamente en la empresa GenScript.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Una vez obtenidos los cDNAs infectivos con las correspondientes mutaciones, se transfectarán células Vero E6 con cada uno de los cDNA generados. Este procedimiento se realizará en frascos de cultivos cerrados. A las 48 -72 horas post-transfección (hpt) se recogerán los correspondientes medios de cultivo que contendrán los virus mutantes defectivos en cada uno de los genes.

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

El origen y la función específica del inserto presente en el vector (BAC) y que codifica rSARS-CoV es:

ORF	Proteína	Start nt	Stop nt
ORF1a	pp1a	265	13398
ORF1b	pp1ab	13398	21485
ORF2	S	21492	25259
ORF 3	3	25268	26092
ORF 4	E	26117	26347
ORF 5	M	26398	27063
ORF 6	6	27074	27265
ORF 7a	7a	27273	27641
ORF 7b	7b	27638	27772
ORF 8a	8a	27779	27898
ORF 8b	8b	27864	28118
ORF 9a	N	28120	29388
ORF 9b	9b	28130	28426

Las ORFs1a y 1b codifican la replicasa viral, que se autoproteoliza para dar lugar hasta a 16 proteínas no estructurales (nsps) que codifican las funciones esenciales para la replicación viral (polimerasa, helicasa, primasa, etc), el metabolismo del RNA (exonucleasa, endonucleasa), la formación del cap de los mRNAs virales (metiltransferasas) y otras funciones necesarias para la formación de estructuras



membranas donde ocurre la replicación viral. Además, muchas de estas nsps están implicadas en la modulación de la respuesta inmune innata.

Las ORFs 2, 4, 5 y 9 codifican las proteínas estructurales de la espícula (S), envuelta (E), membrana (M) y nucleocápsida (N), respectivamente. La proteína S está implicada en la interacción con el receptor celular y determina el tropismo viral. Las proteínas M y E tienen un papel fundamental en el ensamblaje y salida del virus. Además, la proteína E es un factor de virulencia. La proteína N interactúa con el genoma de RNA viral para formar la nucleocápsida, además, esta proteína posee múltiples funciones en la interacción virus-hospedador.

Las ORFs 3, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b codifican las proteínas accesorias específicas de género. Estas proteínas de coronavirus están implicadas en contrarrestar las defensas del hospedador.

Se delecionarán o modificarán los genes específicos de género 3, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b, y el gen estructural E, solos o en distintas combinaciones, con el fin de generar virus atenuados y estudiar el papel de estos genes en la patogénesis del virus.

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

Los insertos contienen las secuencias reguladoras de la transcripción (TRS) tal y como se encuentran presentes en el genoma viral. Cada una de estas secuencias regula la expresión de los genes virales, tal y como sucede en el rSARS-CoV.

No existe ningún otro elemento regulador en los OMGs generados.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí, la secuencia se adjunta (SARSCoV.pdf) así como la secuencia del virus completo SARS-CoV Urbani (referencia GenBank: AY278741)

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

No

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

No



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?: No aplica

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

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

En caso afirmativo:

i) número de copias: No aplica

ii) localización cromosómica: No aplica

iii) secuencias colindantes: No aplica

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

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

Los virus modificados genéticamente corresponderán a virus en los que se habrá suprimido o modificado la expresión de los genes E, 3, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b. Estos virus podrían infectar células Vero, susceptibles a la infección viral, pudiéndose rescatar partículas víricas.

Éstos se comportarán en general como virus atenuados, con menor o igual tasa de replicación y menor patogenicidad que el organismo parental. Así mismo, se pretender generar virus eficientes en replicación y defectivos en propagación, lo que confiere un grado adicional de atenuación a los OMGs generados.

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:

Almazan F. et al, 2006, J. Virol. 80:10900-10906



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:

En cuanto a los virus recombinantes generados no se esperan cambios en la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones en cultivo.

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

Se espera que los recombinantes sin los genes E y 3 sean defectivos en propagación.

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

Los virus defectivos o mutantes en los genes 3, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b y E previsiblemente estarán atenuados en humanos.

De todas formas, todos estos virus estarán confinados dentro del laboratorio de nivel 3 de contención biológica (NCB3).

- 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.

- f) Marcadores específicos del OMG:

El OMG presentará dos cambios de nt en las posiciones nt 10338 y 11163 con respecto a un virus silvestre SARS-CoV. Los virus defectivos llevarán, además, deleciones o modificaciones en los genes 3, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b y E.

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

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



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

Los virus resultantes no se prevé que se integren en el cromosoma de las células utilizadas para crecerlos, por lo que no se transferirá material genético a las mismas. Los virus resultantes estarán confinados en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica (NCB3) y no se utilizarán en ningún caso para infectar organismos, por lo que la posibilidad de transferencia a otros organismos es prácticamente nula.

5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

- Microscopía de fluorescencia mediante anticuerpos específicos de diferentes proteínas del virus SARS-CoV.
- RT-PCR específicas empleando oligonucleótidos complementarios de la secuencia de los genes ORF1b y N del virus SARS-CoV.

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

El OMG no va a estar en el medio ambiente

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

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

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

a) Volumen máximo en el caso de microorganismos: 250 - 375 ml por ensayo

Concentración máxima: Los títulos que se generarán con estos virus oscilan entre 1×10^5 y 5×10^8 ufp/ml.

b) Número de plantas:

c) Número de animales:

En cada ensayo de patogenicidad y protección se utilizarán 60 ratones Balb/c convencionales.



1. Para analizar la **virulencia** de cada mutante los experimentos se realizarán con 1 grupo de ratones no infectados, otro de infectados con el virus silvestre y 4 grupos infectados con los virus mutantes de delección (9 ratones/ grupo). Cada grupo distribuido en dos jaulas (5 para analizar los signos clínicos de la enfermedad y 4 para toma de muestras). Los ratones se anestésarán con isoflurano y se inocularán con una dosis intranasal de 100.000 pfu de virus en 50 µl de DMEM.

2. Para analizar la **protección** conferida **por los virus atenuados** seleccionados en el 1, los experimentos se realizarán con 1 grupo de ratones no vacunados y 5 grupos vacunados con los virus atenuados (9 ratones/grupo). Posteriormente, se analizará el efecto antiviral frente a la infección por SARS-CoV-2-2019. Cada grupo distribuido en dos jaulas (5 para analizar los signos clínicos de la enfermedad y 4 para toma de muestras). Los ratones se anestésarán con isoflurano y se inocularán con una dosis intranasal de 100.000 pfu de virus en 50 µl de DMEM

3. Para el **análisis de drogas antivirales** se utilizarán 5 grupos de ratones que serán inoculados con varias dosis de las drogas seleccionadas y 1 de no tratados. 9 ratones cada grupo distribuidos en dos jaulas (5 para analizar los signos clínicos de la enfermedad y 4 para la toma de muestras). Los animales se inocularán con la dosis de droga optimizada previamente y cinco horas posteriores a la infección se inocularán con una dosis intranasal de 100.000 pfu de virus en 50 µl de DMEM.

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 de cinco años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada.

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

Construcción segura de un vector viral defectivo basado en el virus SARS-CoV que infecte células humanas del tracto respiratorio con objeto de utilizarlo en vacunas. Al dirigirse al tracto respiratorio se espera que se induzca una fuerte respuesta secretora de anticuerpos, que proteja frente a un virus SARS-CoV silvestre.

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 virus utilizado en los ensayos de patogenicidad y protección es el virus recombinante SARS. Este virus se ha construido en la instalación ya autorizada A/ES/00/I-08, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Esta actividad ha sido aprobada por la Comisión Nacional de Bioseguridad (Número de Notificación A/ES/06/16 y A/ES/06/12).



- 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 aplicable² (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*):

El tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación y etiquetado seguirán la legislación internacional y nacional vigente para el transporte de material biológico infeccioso para humanos y animales.

El transporte del virus recombinante SARS-CoV desde el CNB-CSIC (Cantoblanco, Madrid), donde se ha construido, hasta el CISA-INIA (Valdeolmos), donde se realizarán los experimentos con animales, se realizará por una empresa autorizada conforme a dicha normativa como material infeccioso de categoría A.

El transporte de material biológico infeccioso para humanos y animales entre ambas instalaciones se llevará a cabo por una empresa autorizada conforme a dicha normativa como material infeccioso de categoría A.

- 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*):

Ensayos in vitro:

En todos los casos, los virus recombinantes se manejarán en frascos cerrados en todo momento, ya que se utilizará tampón HEPES para mantener estable la concentración de CO₂, en cultivos que implican volúmenes de medio inferiores a 20 ml. Se utilizarán 5 frascos de 75 ml ó 10 frascos de 25 ml por ensayo. Los títulos que se generarán con estos virus oscilan entre 1×10^5 y 5×10^8 ufp/ml. Los virus se pasarán a intervalos de uno a tres días, dependiendo del efecto citopático producido.

Todas las manipulaciones se realizarán en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica (NCB3).

Se utilizarán equipos de protección individual compuestos por un capuz ventilado por el que se hace circular una corriente de aire estéril sobrepresionado. Como es preceptivo, todos los residuos biosanitarios generados se inactivarán en un primer paso en el interior de la cabina de bioseguridad clase IIA. Posteriormente volverán a ser inactivados mediante

² 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/>



autoclave (residuos sólidos) o en la planta de inactivación de efluentes líquidos del laboratorio (residuos líquidos).

Varios miembros del equipo han trabajado con este tipo de virus a lo largo de más de 17 años en el laboratorio NCB3 del CNB y tienen experiencia suficiente y han recibido cursos de formación en bioseguridad en el CNB. En ningún momento se centrifugará el virus no inactivado ni se someterá a manipulaciones que puedan suponer un incremento del riesgo biológico. 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 laboratorio NCB3 con SARS-CoV, guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier animalario de experimentación animal.

Por lo indicado, estas manipulaciones producen mucho menos riesgo que las que se realizan en otros centros con menos condiciones de contención biológica y en los que no se propaga el virus.

Ensayos de patogenicidad y de protección con modelos animales:

Para los estudios de patogenicidad y de protección mediante candidatos vacunales y antivirales se utilizará como modelo animal ratones Balb/c convencionales de 16 semanas de edad adquiridos de Laboratorios Jackson.

Los ensayos de patogenicidad y protección con ratones convencionales se realizarán en el Box Nº 5 del CISA-INIA (Valdeolmos, Madrid). Este box está equipado con una cabina de flujo laminar de clase IIA/B3 y un rack ventilado Allentown. Durante todo el experimento, los ratones permanecen en este rack de aislamiento que dispone de jaulas con doble filtración HEPA para asegurar la contención del virus.

La experimentación con animales en el proyecto “Protección frente a Coronavirus humanos modulando la respuesta inmune innata en jóvenes y mayores y diseño de vacunas” a desarrollar en el CISA-INIA (código de registro ES281620002741) y del que es investigador responsable el Dr. Luis Enjuanes, ha sido autorizado por la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid con fecha 8/10/2019 (Ref PROEX 199/19).

REFERENCIAS

1. Almazán F, Dediego ML, Galán C, Escors D, Alvarez E, Ortego J, Sola I, Zuñiga S, Alonso S, Moreno JL, Nogales A, Capiscol C, Enjuanes L. Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol.* 2006 Nov;80(21):10900-6. PubMed PMID: 16928748.
2. DeDiego ML, Alvarez E, Almazán F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A, Shieh WJ, Zaki SR, Subbarao K, Enjuanes L. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *J Virol.* 2007; 81(4):1701-13. PubMed PMID: 17108030
3. Enjuanes L, Dediego ML, Alvarez E, Deming D, Sheahan T, Baric R. Vaccines to prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced disease. *Virus Res.* 2008;133(1):45-62.. PubMed PMID: 17416434.



4. Alvarez E, DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Jiménez-Guardeño JM, Marcos-Villar L, Enjuanes L. The envelope protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus interacts with the non-structural protein 3 and is ubiquitinated. *Virology*. 2010;402(2):281-91. doi: 10.1016/j.virol.2010.03.015. PubMed PMID: 20409569.
5. Netland J, DeDiego ML, Zhao J, Fett C, Álvarez E, Nieto-Torres JL, Enjuanes L, Perlman S. Immunization with an attenuated severe acute respiratory syndrome coronavirus deleted in E protein protects against lethal respiratory disease. *Virology*. 2010;399(1):120-128. doi: 10.1016/j.virol.2010.01.004. PubMed PMID: 20110095.
6. Zhao J; Falcon A; Zhou H; Netland J; Enjuanes L; Perez Brena P; Perlman S. 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 is required for optimal replication. *J Virol* 83(5):2368-73. [PubMed: 19091867MGI: J:283997](#)

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

La zona de contención biológica de 10.824 m², posee unas características arquitectónicas y funcionales reconocidas internacionalmente para la consecución de la bioseguridad. La característica principal del laboratorio es proporcionar un grado de estanqueidad total para evitar la liberación al medio externo de cualquier agente patógeno sobre el que se esté llevando a cabo alguna línea de investigación.

Para llevar a cabo unas correctas medidas de seguridad, el Centro está diseñado siguiendo unos aspectos arquitectónicos, funcionales y buenas pautas de trabajo adecuados e integrados.

Dentro de los aspectos arquitectónicos y estructurales, el Centro está construido en hormigón armado hidrófugo, cuyo interior está pintado con pintura epoxídica para posibilitar las operaciones de descontaminación. Existen también ventanas blindadas de seguridad.

Todas las entradas a boxes y diferentes zonas o laboratorios, así como las de emergencia, presentan de puertas con cerradura de seguridad y ajuste neumático.

El Centro presenta un modelo tipo “sandwich” donde las zonas de trabajo (laboratorios, animalario y entrada y salida de personal) se localizan en una planta intermedia.

En la planta superior se encuentra todo el sistema de filtración de Alta Eficacia del aire y la planta inferior está habilitada para los procesos de gestión de residuos sólidos y efluentes y para la entrada y salida de animales y material mediante sistemas SAS y Airlocks.

Para asegurar un funcionamiento correcto incluso bajo situaciones de emergencia, todos los dispositivos de seguridad se encuentran instalados de forma redundante (duplicados) o por triplicado.

Dentro de las características funcionales, se encuentran:

- El tratamiento del aire y ventilación estando Las condiciones termo-higrométricas se encuentran reguladas en todo momento. La humedad relativa se mantiene a niveles reducidos (35%) para así evitar que agentes biológicos aerotransportables queden fijados en codos y rugosidades del sistema de circulación del aire.



- Existe establecido en toda la zona Biocontenida, un mantenimiento de la presión negativa respecto a la atmosférica en gradiente diferencial unidireccional de flujo continuo en laboratorios y en cascada en boxes de experimentación de pasos de ente 25 y 35 Pa, generado en extracción dinámica, consiguiendo que el aire siempre circule de zonas teóricamente menos contaminadas a mas contaminadas. El 100% del aire que entra vuelve a salir, en ningún momento se recircula aire.

- El aire de salida es filtrado mediante un sistema simple o doble seriado de filtros HEPA H14 (High efficiency Particulate Air) que consta de una malla filtrante con paso de poro de 99.995% para partículas de máximo poder de penetración en superficie (MPPS) (0.12 μm -0.20 μm). Existen diferentes zonas de filtración de salida independientes correspondientes con distintas secciones del laboratorio, de esta forma en caso de problemas puede evaluarse la efectividad de la zona afectada por separado.

- El control y tratamiento de residuos líquidos generales tiene lugar en la planta inferior del Centro. Con carácter previo se realiza una separación del 100% de los sólidos conformados presentes en el efluente y el 50% de los sólidos en suspensión.

Posteriormente se trata el efluente mediante una esterilización fisicoquímica en 3 reactores de 3 m³ controlando temperatura, presión y pH.

La temperatura se eleva por encima de 136°C durante un tiempo aproximado de 22 minutos. La fase química se realiza mediante la inyección de peróxido de hidrógeno durante el tratamiento térmico.

Existe un sistema adicional de tratamiento de efluentes en casos de emergencia por tratamiento químico.

- Para el control y tratamiento de sólidos biocontaminados existe un horno crematorio pirolítico, diferentes autoclaves de vapor y la presencia de sistemas de descontaminación química (SAS o Airlocks) a base de peróxido de hidrógeno gas o mediante ducha química superficial.

A pesar de todos los recursos tecnológicos y de ingeniería, el buen funcionamiento del área de biocontención se culmina con una correcta actuación del personal trabajador correctamente formado, adoptando de forma obligada medidas de prevención de riesgos laborales

- Control de entrada y salida del laboratorio

La entrada al laboratorio está controlada y supervisada rigurosamente. Sin acreditación correspondiente, no está permitido el acceso. Los visitantes han de ir acompañados en todo momento por el personal de Seguridad Biológica.

Una vez dentro es necesario pasar por un vestuario para liberarse de toda la ropa y objetos personales antes de acceder a la zona biocontenida.

El acceso a la zona de Alta Contención Biológica (NCB3), presenta un riesgo especial para los trabajadores por lo que a esta a zona sólo puede acceder personal especialmente formado y autorizado para trabajar en estas condiciones. Una serie de vestuarios a la entrada y duchas a la salida aseguran la descontaminación obligatoria del personal.



Cada persona que abandone el laboratorio deberá seguir escrupulosamente unas pautas de descontaminación entre las que se incluyen la obligación de descontaminación por arrastre y dilución gracias a la toma una ducha automática de agua de 3 minutos de duración.

Bajo ningún concepto es posible extraer cualquier objeto de dentro del laboratorio sin la descontaminación pertinente.

- Cumplimiento de procedimientos de trabajo y seguridad

Resulta imprescindible por parte de los trabajadores, el cumplimiento de los procedimientos de trabajo (métodos, procedimientos normalizados de trabajo, instrucciones para aseguramiento de calidad, etc.) existentes y por lo tanto la información sobre los riesgos de los productos y operaciones, y las medidas de seguridad y protección a aplicar.

Dentro de ellas, está especialmente controlado el uso obligatorio de equipos de protección individual (EPI), para evitar de forma accidental, inhalaciones, ingestiones, cortes, pinchazos, arañazos, mordeduras o picaduras cuando se enfrentan a situaciones especiales de riesgo biológico.

Para ello el trabajador es formado, informado y acepta dejando constancia documental del cumplimiento de las normas y cuarentenas establecidas (se adjunta formato), destacando:

- Las normas que señalan la protección de las heridas y lesiones de las manos antes de iniciar la actividad laboral.
- Las normas que limitan o prohíben el trabajo directo con animales y/o manejo de equipos contaminados al personal que presenta lesiones cutáneas que no se pueden cubrir.
- La utilización constante de guantes de protección en la manipulación de muestras biológicas, objetos, materia o superficies contaminados con fluidos biológicos, etc.
- La prohibición de comer, beber, fumar, aplicarse cosméticos o llevar lentes de contacto en las áreas de trabajo.
- La obligación del uso de batas de protección, mascarillas y protección ocular (entre otras) en aquellas operaciones que pueden implicar salpicaduras de sangre o fluidos.
- El seguimiento estricto de las instrucciones que contemplan la actuación en caso de accidente o incidente en el que intervenga la presencia de un agente biológico.
- El seguimiento de la situaciones de riesgo adicional que podría suponer a aquellos trabajadores especialmente sensibles (patologías previas, trastornos inmunitarios, embarazo, lactancia, discapacidad, etc.).
- El uso de ropa de trabajo especial como pijamas, camisetas, monos, ropa interior, zuecos o zapatillas, botas, etc.
- El cambio de ropa en los accesos y salidas a la zona de alta seguridad.

De igual manera y en cumplimiento de la legislación vigente, los trabajadores que vayan a desarrollar cualquier actividad en el zona de Contención, se encuentran obligados a recibir formación para el desarrollo de sus tareas que incluyen los siguientes aspectos: agentes



biológicos a los que están expuestos y grupo de riesgo al que pertenecen, prácticas de trabajo seguras, características y uso correcto de los equipos de protección individual [R.D. 664/1997].

- Establecimiento de cuarentenas

Finalmente y en cumplimiento de la legislación y normativa internacional de la OIE y la FAO, todo trabajador de la zona de Contención está sujeto a cuarentenas especiales entendiendo estas como el espacio de tiempo que transcurre entre el abandono de la zona de Riesgo y todo contacto con animales sensibles de contraer enfermedades desarrolladas en el Centro.

Estas cuarentenas varían entre los 3 y 5 días mínimo.

De igual manera que con los equipos de protección individual, el trabajador deja constancia documental de cumplimiento de esta circunstancia (se adjunta formato).

El box de experimentación donde se va a desarrollar las actividades con OMGs del SARS-CoV 2, además de las medidas reflejadas, ofrece:

- Inactivación de residuos en CSB mediante procedimientos normalizados.
- Inactivación de contenedores en las duchas de box.
- Autoclaves de doble frontera animalario/laboratorios y 2º interior NCB3/ exterior NCB3.
- Validaciones microbiológicas de todos los procesos de biodescontaminación por gas y calor mediante *Geobacillus stearothermophilus* en población de 10⁶
- Equipo de 8 personas de técnicos especializados de seguridad biológica.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El CISA está ubicado a 700 m de la localidad de Valdeolmos que presenta una baja densidad de población (< 1.000 habitantes).

No existen próximos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza.

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

- El laboratorio está equipado con medios e infraestructura de biocontención superiores a los establecidos para las operaciones confinadas de Tipo 3, en la legislación de aplicación y normativas nacionales e internacionales.
- La Instalación se encuentra validada por empresa externa, inspeccionada y declara como nivel 3 de contención biológica por el Instituto Regional de Seguridad y Salud en el



Trabajo de la CAM, auditada interna y externamente en riesgo biológico por empresas ajenas, cualificada anualmente por empresa especializadas en CSB y filtración y verificada por el equipo propio de seguridad biológica periódicamente de forma rutinaria y frente a operaciones de mantenimiento correctivo.

- Se dispone de procedimientos de bioseguridad por actividades tales como, investigadores, animalario, seguridad biológica, mantenimiento, limpieza, vigilancia perimetral y equipo médico, donde se especifican las normas de bioseguridad para descontaminaciones, gestión de residuos, operaciones de mantenimiento correctivo, envíos y recepción de muestras, transporte interior, uso de airlocks y SAS, etc.
- Se dispone de un programa mensual, bimestral, trimestral, cuatrimestral semestral y anual de actuaciones de verificación y seguimiento de instalaciones críticas.
- Se dispone de documentos de control de acciones, trabajos y seguimiento de parámetros de bioseguridad.
- Se dispone de estación informática de control y seguimiento de parámetros esenciales de bioseguridad e infraestructura de mantenimiento redundante (interior NCB3-exterior).
- Se dispone de estación informática de seguimiento de parámetros para tratamiento de efluentes redundante (interior NCB3 y exterior).
- Se dispone de redundancia en suministro eléctrico con dos líneas de alta tensión, dos transformadores de baja autoconmutados, dos grupos electrógenos y dos UPS /SAI.
- Todas las operaciones de mantenimiento preventivo se encuentran verificadas.
- Se realiza tratamiento de residuos “in situ”.
- La instalación dispone de un plan de emergencias de actuación en caso de accidente biológico y plan de evacuación sobre incidentes en incendios, aviso de bomba, accidente biológico, químico y evacuación de accidentados.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos. Con fuerte gradiente de temperaturas estacional y 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 desarrollaran en un box de experimentación (nº5) en contención biológica de nivel 3 (NCB3).

Toda la Instalación se encuentra autorizada para trabajos con OMG Tipo 3 (A/ES/00/I-1) con fecha de Resolución de 5 de diciembre de 2000 por la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental; Subdirección General de Impacto Ambiental y Prevención de Riesgos; Secretaría General del Ministerio de Medio Ambiente (nº registro salida 8443).



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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas básicas de bioseguridad seguir son las recogidas en el Manual de Bioseguridad para trabajos en el animalario con SARS - MERS y Manuel de Procedimientos Generales de Bioseguridad para trabajos con SARS-Cov (se adjuntan).

El personal tiene experiencia en trabajos en box NCB3 y técnicas de laboratorio con la infraestructura específica.

2) Formación del personal adscrito:

El personal actuante ha sido formado antes de iniciar la actividad mediante un curso teórico práctico sobre Bioseguridad en contención 3 en el laboratorio y Animalario específico. Fueron sometidos a test de comprensión.

El personal recibe un curso de reciclaje en bioseguridad anualmente.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Limpieza: Se dispone de personal entrenado específico de limpieza para áreas NCB3 comunes.

Se dispone de personal entrenado y acreditado en trabajos de animalario.

Se dispone de procedimientos de desinfección, descontaminación y esterilización que son llevados a cabo por personal técnico especializado en bioseguridad (Técnicos Superiores de Laboratorio y Titulados Superiores en Ciencias).

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

Llevado a cabo por personal especializado en mantenimiento 24horas / 365 días año.

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Llevado a cabo por técnicos especializados en Seguridad Biológica.

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:

In situ: Sólidos:

Dos ciclos por autoclave de vapor 134°C - 18 minutos

Tratamiento químico superficial por ducha química o gas en SAS o Airlocks

Tratamiento químico por inmersión en Dunk Tank

Líquidos:

Tratamiento termo-químico de efluentes

Aire:

Filtración HEPA H14 simple o doble seriada.

Descontaminación por inyección de gas (formaldehído o peróxido de hidrógeno gas) antes de su retirada de caja.- Sistema adicional bag in – bag out

2º Tratamiento del filtro por autoclave de vapor antes de su salida del NCB3.

Exterior: Una vez tratados “in situ”, retirada de vidrio y en su caso de residuos biosanitarios especiales o clase II por gestor acreditado para tratamiento en incineración o autoclave de vapor.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Indicadas en Plan de Evacuación

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Reflejados en procedimientos específicos SARS-Cov

Reflejados en Plan de Evacuación

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Manual de bioseguridad para animalario SARS-Cov;

Plan de Evacuación

Procedimientos de Bioseguridad específicos para SARS-Cov en animalario



4) Planes de emergencia:

Presentado en Protección Civil y expuesto en el acceso a la zona NCB3 para información a personal específico.

Las acciones técnicas son llevadas a cabo por personal CISA-INIA de Dirección, de Seguridad Biológica y de Mantenimiento para control o parada de equipamiento auxiliar (calderas, bombas, equipos de frío o torres de refrigeración, etc.), bajo indicación y supervisión del Jefe de Servicio de Seguridad Biológica.



**EVALUACIÓN DE RIESGO DE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE
ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

1) Entidad

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

Dirección postal: Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). Darwin 3. Campus Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid.

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Mario Mellado García

NIF: 13295208N

Cargo: Director del CNB

Tel: 91 585 45 03 / 4852

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: direccion@cnb.csic.es

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Luis Enjuanes Sánchez

NIF: 19418297-H

Cargo: Profesor de Investigación CSIC

Tel: 91 585 45 55

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: l.enjuanes@cnb.csic.es



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

Nombre y apellidos: Gonzalo Pascual Alvarez

NIF: 05251912T

Cargo: Jefe del Servicio de Seguridad Biológica

Tel: 916202300

Fax: 916202247

Correo electrónico: gpascual@inia.es

5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto

Nombre y apellidos: Fernando Usera Mena

NIF: 00694865-N

Cargo: Responsable del Servicio de Bioseguridad del CNB

Tel: 91 585 45 41

Fax: 91 585 45 06

Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es



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:

El objetivo de la actividad es el diseño de vacunas y la selección de antivirales para proteger frente a la infección respiratoria causada por el coronavirus humano SARS-CoV. Para ello se realizarán ensayos de patogenicidad y protección en ratones susceptibles a la infección viral que mimetizan la enfermedad pulmonar severa observada en humanos. Estos ratones susceptibles son ratones Balb/c convencionales de 16 semanas de edad. La eficacia de los candidatos vacunales o antivirales se determinará en este modelo animal murino. Para conseguir estos objetivos, el único modelo experimental que se puede utilizar son animales y particularmente ratones.

El virus utilizado en los ensayos de patogenicidad y protección es un virus recombinante basado en el genoma del SARS-CoV cepa Urbani (SARS-CoV-2019). La construcción de este virus, realizada en la instalación ya autorizada A/ES/00/I-08, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), ha sido aprobada por la Comisión Nacional de Bioseguridad (Número de Notificación: A/ES/06/16 y A/ES/06/12).

Las diferentes formas de virus SARS-CoV recombinante, con el genoma completo o con deleciones en diferentes genes, se rescatarán a partir de un cromosoma artificial de bacterias (BAC) que crece en *E. coli*, que codifica el cDNA del virus. El genoma completo del virus solo presenta dos mutaciones silenciosas que se han introducido como marcadores genéticos. Además, se construirán mutantes de este coronavirus en los que se delecionarán o modificarán los genes específicos de género 3, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b, y el gen estructural E, solos o en distintas combinaciones. Estos virus rSARS-CoV se rescatarán en células de mamífero a partir de cromosomas artificiales de bacterias que codifican los distintos virus. La construcción de estos mutantes de deleción, realizada en la instalación ya autorizada A/ES/00/I-08, del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), ha sido aprobada por la Comisión Nacional de Bioseguridad (Número de Notificación A/ES/06/16 y A/ES/06/12).

De acuerdo con nuestros resultados previos y con la bibliografía disponible:

- Las proteínas 3 y E son factores de virulencia. Un virus que carezca de la proteína E está atenuado y el virus que no exprese ambas proteínas será eficiente en replicación y defectivo en propagación; pudiendo ser la base para la generación de replicones, con un grado adicional de seguridad.

- Las proteínas 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b son antagonistas de una o varias rutas de señalización de la respuesta inmune innata, por lo que esperamos que modificaciones en las mismas conducirán a virus atenuados. Los genes accesorios específicos de género 3, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b se delecionarán individualmente y en combinaciones de dos o más genes. Los genes accesorios en coronavirus no son esenciales para la replicación viral, pero habitualmente están regulando la virulencia del virus porque intervienen en la interacción con el hospedador.



El objetivo final de la delección y modificación de estos genes es **generar virus atenuados que puedan servir como vacunas seguras.**

2) Duración prevista de la actividad:

(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 de cinco años desde la recepción de la autorización de la actividad confinada



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 organismo receptor en todo momento es un OMG que consiste en un virus recombinante rSARS-CoV, que se obtendrá a partir de un cDNA infeccioso que codifica el cDNA completo del virus referencia (referencia GenBank: AY278741). Este cDNA presenta dos mutaciones silenciosas en los nt 10338 (C por T) y 11163 (T por A) como marcadores genéticos que lo distinguen del genoma del virus silvestre.

Al ser el OMG (rSARS-CoV) idéntico al virus silvestre SARS-CoV aislado de pacientes, excepto en los dos marcadores genéticos, se espera que sea patógeno para humanos, dado que el virus silvestre (SARS-CoV) produce enfermedad respiratoria severa en humanos.

En lo que respecta al hábitat natural del OMG, éste no existe en la naturaleza dado que se ha generado en el laboratorio y permanecerá confinado en las instalaciones NCB3 del CNB-CSIC. El hábitat natural del virus cuyo genoma codifican los fragmentos de cDNA, SARS-CoV silvestre, sin modificaciones, son los seres humanos. El virus silvestre SARS-CoV circuló en la población humana durante el brote iniciado en China en noviembre de 2002, que la OMS declaró terminado en agosto de 2003. En esta epidemia, SARS-CoV infectó 8422 personas y causó la muerte de unas 800. Desde entonces, no se ha detectado la circulación del virus SARS-CoV en la población humana. SARS-CoV es un virus zoonótico. El origen del virus silvestre es el murciélago y las civetas actuaron como animal hospedador intermedio. Los coronavirus SARS-CoV y MERS-CoV, aunque son virus patógenos para humanos, no causan enfermedad en los animales hospedadores intermedios.

b) Organismo donante.

No aplica



c) Inserto.

Los insertos corresponden a fragmentos de DNA que contienen las distintas modificaciones en los genes virales 3, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b y E, que se sintetizarán químicamente. Estos fragmentos se clonarán en el cDNA infeccioso para, posteriormente, rescatar virus defectivos en estos genes virales.

La función de los genes que codifican estos fragmentos se detalla en la Parte A.

Cuando se rescaten los virus recombinantes rSARS-CoV defectivos, los genes estructurales y accesorios se expresarán bajo las secuencias reguladoras de la transcripción del virus silvestre por lo que el nivel de expresión de dichos genes será el mismo que el de los genes del virus silvestre SARS-CoV.

d) Vector.

Para poder realizar la modificación genética del rSARS-CoV se utilizarán como vectores plásmidos pBAC en los que se insertarán los fragmentos con las mutaciones, obtenidos mediante síntesis química.

e) Organismo modificado genéticamente resultante.

A partir de los BACs que contengan los cDNAs modificados genéticamente, se rescatarán virus recombinantes (rSARS-CoV) con mutaciones en alguna de sus proteínas. Estos virus rSARS-CoV se comportarán en general como virus atenuados, con menor o igual tasa de replicación y menor patogenicidad que el organismo parental. Así mismo, se pretender generar virus eficientes en replicación y defectivos en propagación, lo que confiere un grado adicional de atenuación a los OMGs generados.

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

El organismo modificado genéticamente consiste en virus recombinantes derivados de rSARS-CoV en los que se delecionarán o modificarán los genes específicos de género 3, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b, y el gen estructural E, solos o en distintas combinaciones. No se prevé que los virus resultantes tengan efectos tóxicos o alergénicos sobre el hospedador, ya que son virus defectivos mediante la eliminación de genes esenciales.

La patogenicidad del virus recombinante con los genes 3 y E deleccionados será previsiblemente mucho menor que la del organismo donante, de acuerdo con lo observado en otros coronavirus, dado que será eficiente en replicación pero defectivo en propagación. Por tanto, este virus no tendrá capacidad para propagarse ni por el medio ambiente ni en la especie humana, salvo que se haya introducido deliberadamente.

Se prevé que los virus recombinantes con otros genes deleccionados podrían estar atenuados con respecto al organismo receptor rSARS-CoV.



f) Efectos para el medio ambiente.

El virus deficiente en propagación es casi imposible que se propague, puesto que al haberse delecionado los genes 3 y E, es incapaz de salir de la célula una vez que ha entrado. En el caso de que llegara a diseminarse accidentalmente por medio del aire, podría sobrevivir en el medio ambiente, dentro de los humanos, pero no se propagaría a otros seres por ser defectivo.

Los virus mutantes que se generarán no serán patógenos en animales. Tampoco serán patógenos en humanos, por habersele delecionado uno o varios genes. Tampoco serían patógenos para plantas, porque no puede entrar en ellas al no tener estas los receptores apropiados.

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 un box de experimentación animal dotado de toda la infraestructura científica necesaria (CSB, rack ventilado, ultracongelador, etc.) como para no tener necesidad de llevar a cabo actividades de riesgo fuera del mismo en otra área del espacio NCB3.

El OMG estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo. 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.

Los animales de experimentación (ratones), se ubicarán en un rack ventilado dotado de las medidas de seguridad convencionales (presión negativa, filtración HEPA, conexión a Grupo electrógeno y UPS).



Toda la actividad y este rack se situará y desarrollará dentro de un box NCB3 que presenta:

- Ubicación en espacio NCB3,
- Acceso al animalario independiente a través de “preroom” de doble puerta con apertura por huella,
- Puertas de acceso a área de box estancas por junta activa (neumáticas),
- Vestuario interior por box limpio –sucio
- Ducha de descontaminación exclusiva por arrastre y dilución (agua)
- Puertas secundarias de acceso a espacio de box estancas por junta estática,
- Cámaras de vigilancia en box y ojo de buey para vigilancia presencial,
- Presión negativa en 30 Pa mínimo respecto a pasillo de animalario y de 45Pa de este respecto a exterior,
- Doble filtración HEPA en aire de extracción,
- Valvulería automática “airtigh” en impulsión,
- Drenajes con conexión directa a líneas de tratamiento de efluentes por sistema termoquímico validado física y microbiológicamente con carácter anual y microbiológicamente con carácter trimestral,
- Seguimiento de parámetros de biocontención de la Instalación NCB3 por control informático duplicado (interior-exterior), dotado de sistemas de alarma con comunicación por in situ y por e mail,
- suministro eléctrico triple (dos líneas de alta tensión, dos centros de transformación (alta-media), dos grupos electrógenos, dos UPS/SAI,
- Presencia de personal de mantenimiento correctivo, preventivo y predictivo, 24 horas día; 365 días /año.

El riesgo de exposición es muy bajo al disponer de rack ventilado para el aislamiento de ratones y Cabina de Seguridad Biológica Clase II A para toma de muestras y manipulación de animales.

La cabina se validará “in situ” anualmente por empresa ajena y se verifica por personal propio de seguridad biológica y el propio.

No hay riesgo de contagio por contacto.

El riesgo de contaminación indoor out door por estas razones es prácticamente inexistente.

El nivel de biocontención aplicado excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

El servicio de Bioseguridad verifica, vigila y comprueba periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.



Se dispone de procedimientos escritos de bioseguridad para cualquier tipo de operación donde se especifican las normas de bioseguridad, equipos de protección individual necesarios, limpiezas y biodescontaminaciones, cualificaciones y validaciones físicas y microbiológicas, traslado de muestras, envíos y paquetería, accesos de personas, animales y objetos independientes, establecimiento de cuarentenas y gestión de residuos, entre otros.

Se imparten cursos específicos para animalario teórico y práctico antes de iniciar la actividad.

Se realizan seminarios periódicos.

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

b) Concentración y escala utilizadas.

Se utilizará un volumen máximo de 250 – 375 ml por ensayo.

La concentración máxima que se estima es de entre 1×10^5 y 5×10^8 ufp/ml, que son los títulos que se alcanzan en cultivos con este tipo de virus.

En los ensayos con ratones, se inocularán con una dosis intranasal de 100.000 pfu de virus en 50 μ l de DMEM por animal. Se estima que en pulmón se alcanzarán títulos máximos de SARS-CoV de 10^6 - 10^7 pfu por gramo de tejido.

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 los virus defectivos producidos a partir de los cDNAs que contengan deleciones o modificaciones en los genes específicos de género 3, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b, y el gen estructural N, solos o en distintas combinaciones, se realizará en células Vero E6 reduciendo así la capacidad de colonizar los organismos y medio ambiente. Los experimentos se realizarán en el laboratorio de contención biológica de nivel 3 (NCB3), por lo que el personal y el entorno expuestos se reducen al máximo. Además, los virus mutantes generados se prevé que no serán patógenos para el ser humano, y ninguno de ellos será nocivo para el medio ambiente.

La utilización de ratones Balb/c no supondría ningún riesgo, dadas las estrictas medidas de contención en las que se realiza la actividad dentro de la instalación CISA-INIA, que impedirían la liberación estos ratones al medio ambiente.

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 Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) se encuentra ubicado a 700 metros de la localidad de Valdeolmos.

Valdeolmos presenta una densidad de población escasa (< 1000 habitantes). Se asienta en una penillanura a una altitud de 685 m sobre el nivel del mar.

Se encuentra rodeado de tierras de cultivo de secano (trigo, centeno, avena) y no dispone cercana, ninguna explotación ganadera. Es zona CEPA.

Presenta un conjunto de Instalaciones reunidas en un solo edificio subdividido en área administrativa, zona NCB2 y zona NCB3.

Actualmente trabajan alrededor de 170 personas en las diferentes áreas.

- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

Indicadas en el Plan de emergencias y evacuación.

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

Explicados anteriormente y desarrollados en el Plan de emergencias y evacuación y en la parte A (anexo de documentación correspondiente a la solicitud).

- d) Planes de emergencia.

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