



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

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: Universidad de Zaragoza. Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes.

Dirección postal: Pedro Cerbuna, 12. Campus San Francisco, 50009 ZARAGOZA

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Blanca Ros Latienda

NIF: 17205465

Cargo: Vicerrectora de Política científica en funciones

Tel: 976 761759

Fax:

Correo electrónico: vrinves@unizar.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Carlos Martín Montañés, y Julián Pardo Jimeno

NIF: 17866278Q y 25469556 T

Cargo: Profesor e investigadores de la UNIZAR

Tel: 976 76 17 59 y 876554338

Correo electrónico: carlos@unizar.es, pardojim@unizar.es

d) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
A/ES/16/I-24

Nombre y apellidos: Blanca Ros Latienda

NIF: 17205465

Cargo: Vicerrectora de Política científica en funciones

Tel: 976 761759

Fax:

Correo electrónico: vrinves@unizar.es

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



Julián Pardo y Carlos Martín

- 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:

COV20/00820 estudio de la protección de BCG y MTBVAC contra SARS-Cov-2 en primates. FONDO-COVID19, ISCIII 2020. IP: Carlos Martín (Universidad de Zaragoza).

COV20-00308. Análisis de marcadores solubles de activación inmunológica y de poblaciones de células NK y T CD8 en pacientes con infección por SARS-CoV-2.FONDO-COVID19, ISCIII 2020. IP: Julian Pardo (IIS Aragon).

RTI2018-097625-B-I00: Estudio inmunidad innata entrenada conferida por las vacunas vivas atenuadas, BCG y MTBVAC y su aplicación para el uso terapéutico en enfermedades con componente inmunológico. Agencia estatal de investigación; fondos FEDER. IPs Carlos Martín /Juan Ignacio Aguiló. (Universidad de Zaragoza). 01/01/2019- 31/12/2022.

SAF2017-83120-C2-1-R Granzimas extracelulares en inflamación, autoinmunidad e inmunoterapia de cáncer: Detección de formas activas, mecanismos de acción, inhibición y valor pronóstico. Agencia estatal de investigación; fondos FEDER. IP Julián Pardo (Universidad de Zaragoza).

- 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: CIOMG 14.09.16
- b) Número de referencia del expediente: A/ES/16/I-24

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

Antecedentes:

La actual vacuna contra la tuberculosis (TB), BCG es usada de forma universal en países con una incidencia media alta de la enfermedad, siendo su cobertura cercana al 90%, aunque su protección contra las formas respiratorias de la TB es baja³. Numerosos estudios indican que BCG tiene efectos beneficiosos adicionales a los que confiere su protección específica

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.



contra la TB induciendo protección contra otros patógenos⁴, al igual que otras vacunas vivas atenuadas en uso⁵. Los efectos beneficiosos no específicos de BCG se han atribuido a la capacidad de la vacuna para reprogramar funcional y epigenéticamente las células inmunes innatas, como los monocitos, los macrófagos y las células NK, un proceso denominado "inmunidad entrenada"⁶. En los monocitos humanos, la inmunidad entrenada inducida por BCG activa vías metabólicas, que están reguladas por mecanismos epigenéticos a nivel de la organización de la cromatina aumentando la expresión de citoquinas relacionadas con la respuesta inmunitaria celular del huésped⁷.

Dada la baja protección de BCG contra las formas respiratorias de TB, desde hace más de 20 años nuestros equipos españoles trabajan en una nueva vacuna viva atenuada denominada MTBVAC. Esta nueva vacuna MTBVAC ha sido construida racionalmente atenuando un aislado clínico de *M. tuberculosis*, a diferencia con la actual vacuna BCG derivada de una cepa de *Mycobacterium bovis*, causante de TB en animales. MTBVAC contiene todos los genes presentes en las cepas que infectan a humanos, incluidos los genes ausentes de la actual vacuna BCG⁸. MTBVAC contiene dos mutaciones de delección estables independientes en los genes de virulencia *phoP* y *fadD26*, cumpliendo los requisitos del consenso de Ginebra para el avance de las vacunas vivas atenuadas de TB a ensayos clínicos⁹.

Los estudios de seguridad de MTBVAC en adultos¹⁰ y en bebés¹¹ muestran unos perfiles de seguridad de MTBVAC similares a los de BCG, una inmunidad dosis dependiente y mayor inmunidad al estímulo con antígenos de TB para MTBVAC que BCG en los bebés. Actualmente están finalizando dos estudios de Fase2a para la definición de dosis en adultos (NCT02933281) y en recién nacidos (NCT03536117) en Sudáfrica. Nuestros estudios recientes en colaboración con el equipo del Profesor Netea de la Universidad de Radboud en Nimega, Holanda, muestran que MTBVAC en células mieloides primarias humanas es capaz de inducir inmunidad entrenada no específica a través de cambios epigenómicos que conllevan el aumento de la metilación de histonas en los promotores de genes de citoquinas proinflamatorios comparables a los producidos por BCG¹². MTBVAC confiere una inmunidad innata similar a la proporcionada por BCG, y en colaboración con el Dr Yuste del Centro Nacional de Majadahonda del Instituto de Salud Carlos III MTBVAC muestra una mejor protección en un modelo experimental de neumonía por *Streptococcus pneumoniae*¹².

Respecto a los mecanismos inmunológicos responsables del posible efecto beneficioso de estas vacunas sobre el sistema inmune innato y adaptativo, todavía se desconoce el papel de las células del sistema inmune innato, en especial de las células NK y su relación con una activación posterior de la respuesta de células T CD4 o CD8. En este contexto resulta de especial relevancia el estudio del sistema perforina/granzimas y los ligandos de muerte (TNFa, TRAIL y FasL), dado que son los mediadores principales de las células NK, responsables de la eliminación de células infectadas (perforina, granzima B, FasL y TRAIL) y más recientemente, también de la activación de procesos inflamatorios (TNFa, FasL, granzimas A y K)¹³. Precisamente el estudio de estas moléculas efectoras durante enfermedades infecciosas e inflamatorias ha sido la principal línea de investigación del equipo de Julian Pardo en la Universidad de Zaragoza¹³ durante casi 20 años¹⁴. En concreto



se ha observado que la ausencia de granzima B o perforina¹⁴ afecta al control de infecciones intracelulares mientras que la ausencia de granzima A protege de la patología inflamatoria asociada a infecciones como la sepsis^{15, 16, 17}. Teniendo en cuenta estas bases se espera que la ausencia de células NK o de perforina o granzima B reduzca la eficacia de la vacuna, mientras que la ausencia de granzima (o su inhibición) podría tener un efecto beneficioso dado que reduciría la patología inflamatoria asociada al SARS.

Finalidad de la actividad:

El principal objetivo es establecer un modelo murino de **SARS** para el análisis de eficacia de las vacunas BCG y MTBVAC y el estudio del mecanismo inmunológico y posibles nuevas dianas durante el SARS, incluyendo la **COVID19**. Para ello se usará la cepa rSARS-CoV-M15¹ adaptada a ratón y las cepas de ratón Balb/c, y C57Bl/6 utilizando diferentes vías de administración. En concreto se usará el virus **rSARS-CoV-MA15** cuya generación se describe en Fett et al 2013. Se trata de una primera aproximación en este modelo, para posteriormente validar los resultados en ratones transgénicos que expresan el receptor humano ACE2 usando una cepa del SARS-CoV-2 y en futuros modelos de cepas de SARS-CoV-2 adaptadas a ratón.

Se estudiará el mecanismo de inflamación activado por la cepa adaptada a ratón “in vivo” utilizando ratones wt o deficientes en perforina, gzmA, gzmB o gzmK e inhibidores de otros mecanismos efectores de células T y NK como TNFa, FasL o TRAIL. Esta actividad se encuadra dentro de un proyecto más amplio que analiza la eficacia de BCG y MTBVAC frente a SARS-CoV-2 en macacos y nos va a permitir estudiar en mayor profundidad los mecanismos de protección en un modelo murino de SARS.

El estudio se realizará en el animalario de Seguridad Biológica NCB3 del Centro de Encefalopatías de la Universidad de Zaragoza en colaboración con el equipo del Profesor Luis Enjuanes Centro Nacional de Biotecnología (CNB- CSIC), que adaptó la cepa de SARS-CoV a infección en ratón y con enorme experiencia en su uso en modelo vacuna

Los virus que se van a utilizar en este trabajo son virus recombinantes adaptados a ratón mediante modificación genética basados en el genoma del coronavirus SARS-CoV cepa Urbani¹. La construcción de estos recombinantes, se realizó por el equipo de Luis Enjuanes 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 Consejo Interministerial de OMG –CIOMG- (Número de Notificación A/ES/06/16 y A/ES/06/12).

Los objetivos concretos de la presente propuesta son:

- Establecer el modelo de infección con una cepa de SARS-CoV adaptada a ratón MA15 como modelo animal para estudiar el mecanismo inmunológico implicado en SARS y su aplicación al tratamiento de la infección por SARS-CoV-2 y la COVID19.
- Analizar la eficacia de la vacunación con BCG y MTBVAC, en ratones wt Balb/c y C57Bl/6 frente a la infección por rSARS-CoV-MA15.



- Analizar el curso de la infección con las cepas adaptadas a ratón en ratones wt o deficientes en perforina, *gzmA*, *gzmB* o *gzmK* vacunados o no con BCG y MTBVAC. Replicación viral, inflamación y mortalidad/morbilidad.

- Analizar el efecto de inhibidores de las diferentes moléculas efectoras de células Tc y NK (Fas, TRAIL, IL6, *gzmA*, *gzmB* o *gzmK*) sobre el curso de la infección con la cepa adaptada a ratón en ratones wt vacunados o no con BCG y MTBVAC.

El establecimiento del modelo animal usando la cepa MA15 permitirá complementar dichos estudios en marcha y estudiar en mayor profundidad la eficacia de esta vacuna y el mecanismo implicado. Estos resultados se validarán posteriormente en un modelo de ratón que exprese ACE2 humano usando el virus SARS-CoV-2. Para ello se realizarán ensayos de patogenicidad y protección en ratones convencionales Balb/c, y C57Bl/6 frente a la infección con la cepa adaptada a ratón rSARS-CoV-MA15, desarrollada en el laboratorio del Dr. Luis Enjuanes. Los ratones Balb/c, y C57Bl/6 son susceptibles a la infección viral, y mimetizan la enfermedad pulmonar severa observada en humanos, causando patología y una alta letalidad. Con el fin de analizar la respuesta inmunológica frente a la infección, así como su implicación en los mecanismos de protección activados por las vacunas BCG y MTBVAC, también se utilizarán otras cepas de ratón.

Referencias

1. Fett et al. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. *J Virol*. 2013 Jun;87(12):6551-9.
2. WHO. Global Tuberculosis Report 2019. 1–297 (2019).
3. Kleinnijenhuis, J. J. *et al*. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 17537–17542 (2012).
4. Benn et al A small jab - a big effect: nonspecific immunomodulation by vaccines. *Trends in Immunology* 34, 431–439 (2013).
5. Netea, M. G. *et al*. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* 352, aaf1098–aaf1098 (2016).
6. Netea, M. G. *et al*. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 173, 89 (2020).
7. Aguilo, N et al Reactogenicity to major tuberculosis antigens absent in BCG is linked to improved protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Communications* 2017, 8, 16085.
8. Arbués, A. *et al* Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine* 2013, 31, 4867–4873.
9. Spertini, F. *et al*. Safety of human immunisation with a live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine: a randomised, double-blind, controlled phase I trial. *The Lancet Respiratory Medicine* 3, 953–962 (2015).
10. Tameris, M. *et al*. Live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MTBVAC versus BCG in adults and neonates: a randomised controlled, double-blind dose-escalation trial. *The Lancet Respiratory Medicine* 1–14 (2019). doi:10.1016/S2213-2600(19)30251-6.
11. Tarancón, R.; Domínguez-Andrés, J.; Uranga, S.; Ferreira, A. V.; Groh, L. A.; Domenech, M.; González-Camacho, F.; Riksen, N. P.; Aguilo, N.; Yuste, J.; Martin, C.; Netea, M. G. New live attenuated tuberculosis vaccine MTBVAC induces trained immunity and confers protection against experimental lethal pneumonia. *PLoS Pathog* 2020, 16, e1008404.
12. Martínez-Lostao, L, Anel, A and Pardo, J. How do cytotoxic lymphocytes kill cancer cells? *Clinical Cancer Research* 2015, 21; 5047
13. Arias MA, Martínez-Lostao, L, Santiago L, Ferrandez, A, Granville, D and Pardo, J. The Untold Story of Granzymes in Onco-Immunology: novel opportunities with old acquaintances. *Trends in Cancer*, 2017, (6):407-422
14. Arias MA, Jiménez de Bagües MP, Aguiló N, Menao S, Hervás-Stubbs S, de Martino A, Alcaraz A, Simon MM, Froelich CJ and Pardo, J. Elucidating Sources and Roles of Granzymes A and B during Bacterial Infection and Sepsis. *Cell Reports*, 2014, 8, 420–42



15. Garzón-Tituaña M, Arias MA, Sierra-Monzón JL, Morte-Romea E, Santiago L, Ramirez-Labrada A, Martinez-Lostao L, Paño-Pardo JR, Galvez EM, Pardo J. The Multifaceted Function of Granzymes in Sepsis: Some Facts and a Lot to Discover. Front Immunol. 2020 Jun 17; 11:1054.
16. Santiago L, Castro M, Sanz-Pamplona R, Garzón M, Ramirez-Labrada A, Tapia E, Moreno V, Layunta E, Gil-Gómez G, Garrido M, Peña R, Lanuza PM, Comas L, Jaime-Sanchez P, Uranga-Murillo I, Del Campo R, Pelegrín P, Camerer E, Martínez-Lostao L, Muñoz G, Uranga JA, Alcalde A, Galvez EM, Ferrandez A, Bird PI, Metkar S, Arias MA, Pardo J. Extracellular Granzyme A Promotes Colorectal Cancer Development by Enhancing Gut Inflammation. Cell Rep. 2020 Jul 7;32(1):107847.

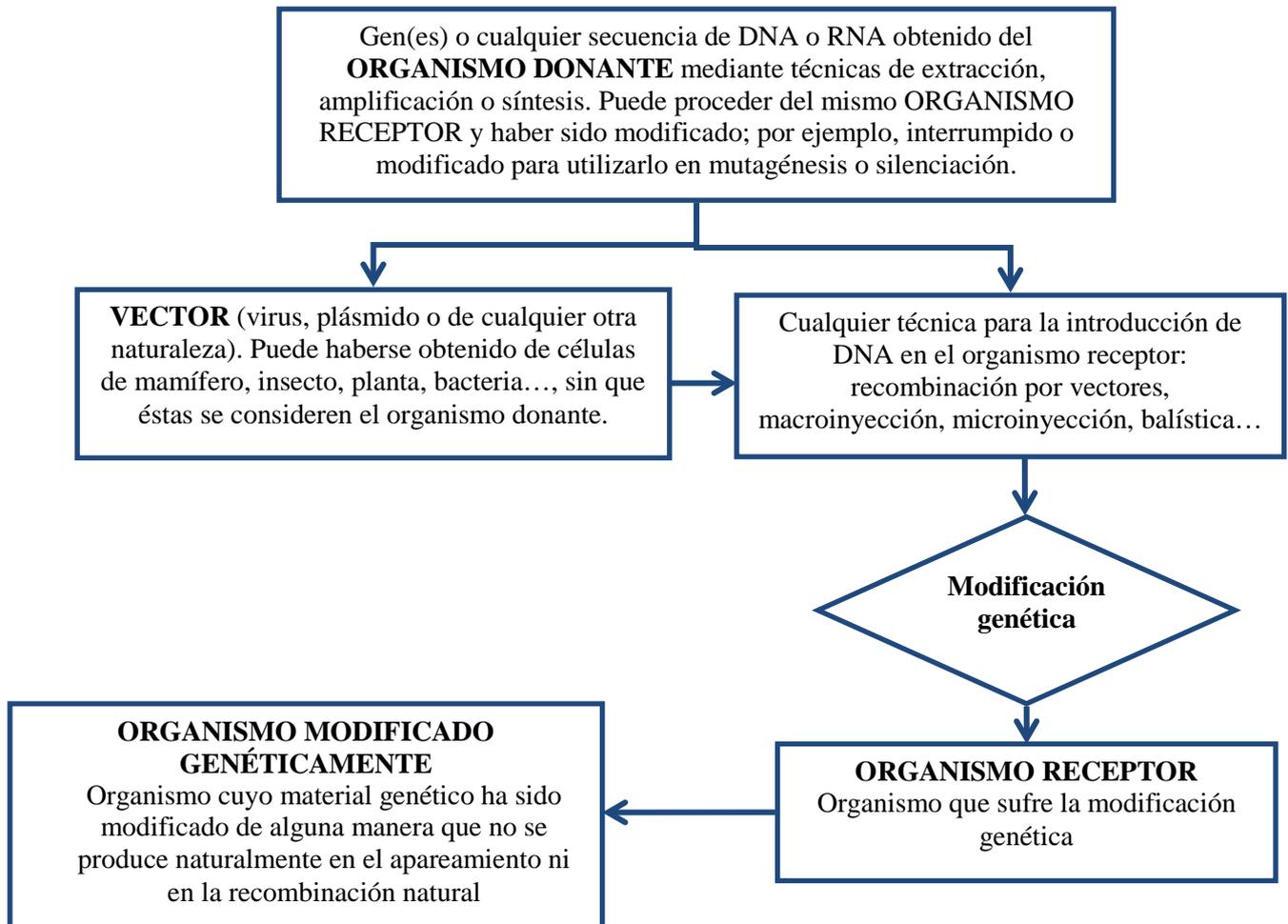
1) Clasificación de la actividad:

(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 (r) SARS-CoV. El organismo receptor es la cepa rSARS-CoV portadora de dos mutaciones silenciosas en los nt 10338 (C por T) y 11163 (T por A) como marcadores genéticos.

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

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

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

a) Técnicas de aislamiento: El virus rSARS-CoV se obtuvo a partir de un clon (cDNA) infeccioso. Este cDNA codificaba 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 clonaron 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 mantuvo en un cromosoma artificial de bacterias (BAC), que se utilizó como vector y se amplificó en una cepa de bacterias *Escherichia coli* no patógena. La última etapa del clonaje y el rescate del virus se realizó en el laboratorio NCB3 del CNB-CSIC. Para aislar el virus rSARS-CoV se transfectaron células Vero E6 con el cDNA generado. Este procedimiento se realizó en frascos de cultivos cerrados. A las 48 -72 horas post-transfección (hpt) se recogió el medio de cultivo que contendría 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 A/ES/06/16 y A/ES/06/12 (Nieto-Torres J.L. et al, 2014, PLoS Pathog. 10: e1004077; Jimenez-Guardeño J.M. et al, 2014, PLoS Pathog. 10: e1004320).

- b) Técnicas de identificación

Para la identificación del rSARS-CoV se amplifica su genoma mediante RT-PCR y se procede a secuenciar completamente el genoma viral. De este modo, se comprobó 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 aplicables

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 han dado pocos casos 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

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 8 de 28 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 aplicable

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, estarán libres de agente 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, similares al del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes en Zaragoza, donde se llevará a cabo el uso del OMG derivado. Este centro ha sido acreditado previamente para el uso de OMGs en actividades de tipo 3 (Nº notificación: A/ES/16/I-24 autorizada según CIOMG: 17.05.17.

Nuestro grupo ha estado trabajando durante más de 15 años con virus y otros patógenos incluyendo respiratorios de tipo 3 como LCMV, Ectromelia, *M. tuberculosis* o *Brucella spp.* Durante los últimos 7 meses hemos trabajado también con el SARS-CoV-2, coronavirus causante de la COVID19. De hecho, nuestro equipo ha aislado la primera cepa en la Comunidad de Aragón con la que lleva trabajando desde abril y con la que se ha llevado el primer estudio que se encuentra en fase de revisión, trabajo coordinado por Julián Pardo en colaboración con el equipo de Carlos Martín (*Santiago et al. Determination of the concentration of IgG against the Spike Receptor-Binding Domain that predicts the viral neutralizing activity of convalescent plasma and serum against SARS-CoV-2*). En la actualidad 5 miembros del equipo trabajan de modo regular con el virus SARS-CoV-2 no modificado en diferentes proyectos financiados por el IS Carlos III y el Gobierno de Aragón.

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 aplicable

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 interactúa con otros organismos ya que estará 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 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:

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:



Modificación de genes de rSARS-CoV (sustitución de bases) para generar una cepa recombinante adaptada a ratón (MA15) y que permita estudiar la interacción con el hospedador y virulencia de dicho virus en un modelo in vivo, así como analizar la eficacia de diferentes tratamientos incluyendo vacunas. La modificación se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Luis Enjuanes. En concreto para la generación del mutante MA15 adaptado a ratón se introdujeron 6 mutaciones dentro de Nsp5 (H133Y, K268N), Nsp9 (T67A), Nsp13 (A4V), S protein (Y436H), y M protein (E11K), generándose así la cepa rMA15 como se describe en Fett et al. J Virol 2003. Estas mutaciones se basaron en las descritas para la cepa no recombinante MA15 que se generó mediante infecciones consecutivas en ratones Balb/c (Roberts A, et al 2007. e) PLoS Pathog). Al contrario que la cepa original SARS-CoV aislada de humanos la cual no es virulenta en ratones, la cepa MA15 mostraba alta virulencia en ratones envejecidos.

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

Se utilizó un sistema de genética inversa usando un cromosoma artificial de bacterias (BAC) descrito en detalle anteriormente (Almazán et al J Virol 2006). Tal y como se ha indicado anteriormente esta modificación se llevó cabo en el laboratorio del Dr. Luis Enjuanes, el cual nos cederá el virus rSARS-CoV-MA15.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

Cromosoma artificial bacteriano (pBAC-SARS-CoV) que contiene el cDNA correspondiente al RNA del virus.

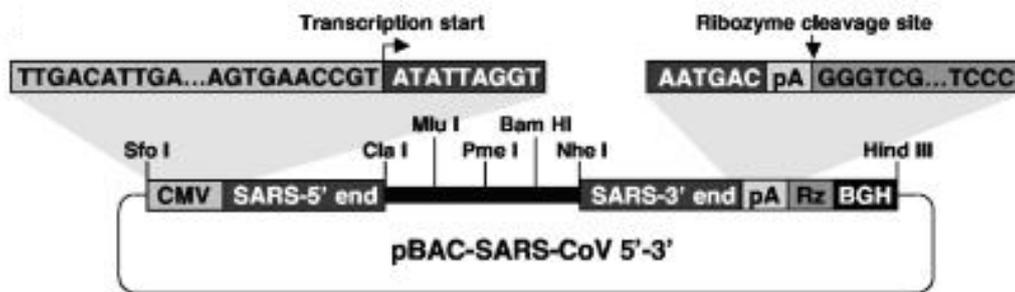
b) Si se trata de un virus:

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 mapa y todos detalles del inserto se describen en detalle en las referencias originales y en las solicitudes previas A/ES/06/16 y A/ES/06/12. Almazán, Dediego, Galán, Escors, Alvarez, Ortego, Sola, Zuñiga, Alonso, Moreno, Nogales, Capiscol and Enjuanes Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. J Virol. 2006; Fett, DeDiego, Regla-Nava, Enjuanes and Perlman. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. J Virol. 2013 Jun;87(12):6551-9.

Está basado en el vector pBELOBAC11 (<https://www.addgene.org/vector-database/6242/>).



d) Gama de hospedadores del vector:

Bacterias

e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

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

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

5) Información del inserto:

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

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

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

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

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

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

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

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



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? No aplicable

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

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

En caso afirmativo:

i) número de copias: No aplicable

ii) localización cromosómica: No aplicable

iii) secuencias colindantes No aplicable

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.

Artículo: Fett , DeDiego, Regla-Nava, Enjuanes and Perlman. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. J Virol. 2013 Jun;87(12):6551-9.

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

El receptor es un SARS-CoV humano no virulento en ratones. El OMG derivado se ha adaptado para que provoque enfermedad en ratones.

- d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:
- e) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese:
- f) Marcadores específicos del OMG:

Virus rMA15: Mutaciones dentro de las secuencias que codifican las proteínas Nsp5 (H133Y, K268N), Nsp9 (T67A), Nsp13 (A4V), S protein (Y436H), y M protein (E11K).

- 2) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):
- 3) 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 animalario de nivel 3 de contención biológica (NCB3) y sólo se utilizarán para infectar ratones, en los que al igual que en los cultivos, no se prevé que se integren en sus células.

- 4) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:
Secuenciación y PCR.
- b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:
El OMG no se va a liberar al 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:

Para las infecciones con animales un máximo de 5×10^6 pfu (1×10^5 pfu / animal) en un volumen máximo de 1 ml.

Número de plantas:

b) Número de animales: En cada ensayo de patogenicidad y protección se utilizarán un máximo de 30 ratones Balb/c o C57Bl/6.

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

Noviembre 2020 – diciembre 2025

(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).

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

- analizar la eficacia de la vacunación de BCG y MTBVAC, en ratones wt Balb/c y C57Bl/6 frente a la infección con la cepa rSARS-CoV-MA15.

- analizar el papel de la respuesta inflamatoria y de las células T y NK en el curso de la infección con la cepa adaptada a ratón en ratones wt vacunados o no con BCG y MTBVAC.

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 procede del CNB, Dicho centro ha sido registrado previamente tal y como se indica en 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 microorganismo será enviado cumpliendo todas las medidas de seguridad según el reglamento de transporte de materias peligrosas por carretera. Los destinatarios cumplimentarán toda la documentación requerida, tal como corresponde a material infeccioso 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*):

El transporte de los cultivos de virus se llevará a cabo mediante la empresa autorizada para el transporte de materias peligrosas, utilizando triple envase y siguiendo la legislación vigente.

Para los estudios de patogenicidad y de protección mediante la vacuna se utilizará como modelo animal ratones Balb/c y C57Bl/6 convencionales de 16 semanas de edad adquiridos de Laboratorios Envigo.

Ensayos de patogenicidad

Se infectarán los diferentes grupos de animales con 1×10^5 pfu de virus en 30 μ l de medio por vía intranasal y se evaluará la evolución de la enfermedad mediante determinación del peso y la morbilidad siguiendo las directrices éticas aprobadas. En algunos casos a las 24 horas de la infección se les aplicará salina o una dosis única de los tratamientos a analizar (i.e. inhibidores de granzima, de Fas, de TRAIL o de TNFa) por vía intraperitoneal. Se seleccionarán grupos de ratones que se sacrificarán a diferentes tiempos para estudios de citometría de flujo y de anatomía patológica. Todas las muestras de los animales se inactivarán con protocolos adecuados (paraformaldehído 4% durante 30 minutos) antes de ser extraídas de la instalación NBC3.

Ensayos de protección

Se inmunizarán los animales por vía intranasal con BCG o MTBVAC y tras 60 días se infectarán con 1×10^5 pfu de virus en 30 μ l de medio por vía intranasal y se evaluará la evolución de la enfermedad tal y como se describe arriba.

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/>



Los ensayos de patogenicidad y protección con ratones convencionales se realizarán en el animalario del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes. Este recinto está equipado con una cabina de flujo laminar de clase IIA/B3 y un rack ventilado. 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.

Varios miembros del equipo han trabajado durante más de 15 años con virus y otros patógenos incluyendo respiratorios de tipo 3 como LCMV, Ectromelia, *M. tuberculosis* o *Brucella* spp. Durante los últimos 7 meses hemos trabajado también con el SARS-CoV-2, coronavirus causante del COVID19. De hecho, nuestro equipo ha aislado la primera cepa en la Comunidad de Aragón con la que lleva trabajando desde abril y con la que se ha llevado el primer estudio que se encuentra en fase de revisión. Estos miembros tienen experiencia suficiente y han recibido cursos de formación en bioseguridad. 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 la instalación NCB3 con SARS-CoV, guardarán cuarentena antes de entrar a cualquier otro animalario de experimentación animal.

La experimentación con animales se enmarca dentro del procedimiento “Estudio del papel del sistema perforina/granzimas en el daño inflamatorio asociado a la infección por el virus SARS-CoV-2 y de la eficacia de inhibidores que impiden la entrada del virus a las células” y del que es investigador responsable el Dr. Julián Pardo, ha sido autorizado por la Comunidad Autónoma de Aragón (PI44/20).

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. 21 de 284.
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. Roberts A, Deming D, Paddock CD, Cheng A, Yount B, Vogel L, Herman BD, Sheahan T, Heise M, Genrich GL, Zaki SR, Baric R, Subbarao K. 2007. A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/c mice. *PLoS Pathogens*.
7. Fett , DeDiego, Regla-Nava, Enjuanes and Perlman. Complete protection against severe acute respiratory syndrome coronavirus-mediated lethal respiratory disease in aged mice by immunization with a mouse-adapted virus lacking E protein. *J Virol*. 2013 Jun;87(12):6551-9
8. Almazán , Dediego, Galán, Escors, Alvarez, Ortego, Sola, Zuñiga, Alonso, Moreno, Nogales, Capiscol and Enjuanes Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis. *J Virol*. 2006
9. 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

Los laboratorios cuentan con medidas de confinamiento de nivel 3, presión negativa, SAS, autoclave de doble puerta, zona de acceso para cambio de ropa, zona de duchas de descontaminación, sala sucia para lavado de material. Las indicaciones de uso, acceso y limpieza de las distintas zonas están recogidas en el Anexo a esta documentación.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El CIEETE donde se ubica el animalario NCB3, es un edificio independiente, aunque está ubicado dentro de un Campus Universitario, con edificios de aulas y servicios cercano.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Zaragoza está situado en el centro del valle del Ebro. Temperaturas calurosas en verano, llegando a alcanzarse hasta los 40° en días puntuales, y frío ligero en invierno, llegando a mínimas de -2 -3°C puntualmente. Viento a rachas con una frecuencia del 40% y una velocidad media de 30km/hora.

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:

Animalario CIEETE: N° notificación: A/ES/16/I-24 autorizada según CIOMG: 17.05.17, como de nivel 3



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 son las recogidas en el Manual para trabajos en animalarios y laboratorios con agentes de nivel 3.

El personal tiene experiencia en trabajos en el BSL3 y en técnicas de laboratorio en estas infraestructuras.

- 2) Formación del personal adscrito:

Personal con amplia experiencia en los últimos años en el trabajo con agentes patógenos de nivel 3, tanto en cultivos, aislamientos, y técnicas de biología molecular, inmunología y trabajo con animales.

Disponen de curso de capacitación en experimentación animal de niveles, B, C y D.

Todos ellos están formados para trabajar en condiciones de contención, y seguridad, y a la llegada a esta instalación recibieron un “training “en uso, acceso y manejo de la instalación”

- 3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Todo el material que se utilice dentro será descontaminado con los productos adecuados (ver procedimiento de uso), y los desechos contaminados, se retiraran siguiendo la normativa de residuos peligrosos infecciosos de la instalación. La empresa FCC es la que en estos momentos recoge los residuos biológicos de grupo III, de las instalaciones. Las jaulas de los animales se manipularán siempre dentro de la Cabina, se autoclavarán previamente a su lavado.

- 4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

- 5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Registro de presiones, temperaturas, acceso usuarios.

X. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

- 1) Encargado de la gestión de residuos:

- | | | | | |
|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|--------------------------|
| a) gestión interna: | SÍ | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| b) gestión por una empresa externa: | SÍ | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |

Si es el caso, nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:

La Universidad de Zaragoza, tiene contratada para la retirada de Residuos biológicos peligrosos, a la empresa FCC, que recoge de acuerdo a una periodicidad establecida, los residuos del Edificio de Encefalopatías de la Facultad de Veterinaria.

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



El material utilizado será desechable, con lo que todo el material será eliminado. Los restos de cultivo, mediante inactivación con el desinfectante disponible en la CBS, de acuerdo al PNT de “Acceso y Uso laboratorio”.

Las jaulas de los ratones, se manipularán en la cabina, nunca fuera, se retirará el material sobrante, y todo se autoclava a 121°C durante 20 minutos antes de proceder a su limpieza, para volver a reutilizar. El aire de la zona es filtrado mediante filtros HEPA H14.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Rotura golpes en contenedores cultivos, rotura en centrifugación, Indicadas todas ellas en el plan de autoprotección del Edificio

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

EPIS de seguridad (monos, mascarillas, máscara antisalpicaduras, Cabinas de bioseguridad, Centrífugas con rotores antierosoles, racks con filtros HEPA, y ventilación independiente

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Usuarios con experiencia en el trabajo con virus en condiciones de contención biológica, tal como se indica anteriormente. Training de acceso, uso de la instalación previa a su comienzo.

4) Planes de emergencia:

La Facultad de Veterinaria, y en concreto el Edificio de Encefalopatías actualiza el plan de emergencias del edificio. Salidas de emergencias y evacuación indicado en la cartelería de la que dispone el edificio. Todo este material está disponible para los investigadores involucrados, la Unidad de Prevención de Riesgos laborales de la institución suministra este tipo de material previo a la firma de cualquier contrato de trabajo, tanto investigador, como laboral.

Las instalaciones, en sus PNT “Acceso y Uso del laboratorio”, contiene un apartado en el que se describe la actuación a llevar a cabo en caso de producirse una emergencia dentro de la propia sala de contención.



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

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

- 1) Entidad
Nombre: Universidad de Zaragoza. Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes.
Dirección postal: Pedro Cerbuna, 12. Campus San Francisco, 50009 ZARAGOZA
- 2) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: Blanca Ros Latienda
NIF: 17205465
Cargo: Vicerrectora de Política científica en funciones
Tel: 976 761759
Fax:
Correo electrónico: vrinves@unizar.es
- 3) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos: Carlos Martín Montañés, y Julián Pardo Jimeno
NIF: 17866278Q y 25469556 T
Cargo: Profesores e investigadores de la UNIZAR
Tel: 976 761759 y 876554338
Fax:
Correo electrónico: carlos@unizar.es, pardojim@unizar.es
- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad

A/ES/16/I-24
Nombre y apellidos: Blanca Ros Latienda
NIF: 17205465
Cargo: Vicerrectora de Política científica en funciones
Tel: 976 761759
Fax:
Correo electrónico: vrinves@unizar.es
- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto:

Julián Pardo Jimeno y Carlos Martín Montañés



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 principal objetivo es establecer in modelo murino de **SARS** para el análisis de eficacia de las vacunas BCG y MTBVAC y el estudio del mecanismo inmunológico y posibles nuevas dianas durante el SARS, incluyendo la **COVID19**.

Los virus que se van a utilizar en este trabajo son virus recombinantes adaptados a ratón mediante modificación genética basados en el genoma del coronavirus SARS-CoV cepa Urbani. La construcción de estos recombinantes, se realizó 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). En concreto se usará el virus **rSARS-CoV-MA15** cuya generación se describe en la publicación *Fett et al. J Virol. 2013 Jun;87(12):6551-9*.

Con este virus se pretenden los siguientes objetivos.

- Establecer el modelo de infección con una cepa de SARS-CoV adaptada a ratón MA15 como modelo animal para estudiar el mecanismo inmunológico implicado en SARS y su aplicación al tratamiento de la infección por SARS-CoV-2 y la COVID19.
- Analizar la eficacia de la vacunación con BCG y MTBVAC, en ratones wt Balb/c y C57Bl/6 frente a la infección por SARS-CoV-MA15.
- Analizar el curso de la infección con las cepas adaptadas a ratón en ratones wt o deficientes en perforina, gzmA, gzmB o gzmK vacunados o no con BCG y MTBVAC. Replicación viral, inflamación y mortalidad/morbilidad.
- Analizar el efecto de inhibidores de las diferentes moléculas efectoras de células Tc y NK (Fas, TRAIL, IL6, gzmA, gzmB o gzmK) sobre el curso de la infección con la cepa adaptada a ratón en ratones wt vacunados o no con BCG y MTBVAC.

En la actualidad se está analizando la eficacia de BCG y MTBVAC para proteger frente a SARS-CoV-2, en un modelo de macaco. en el Centro. Además, se está evaluando la respuesta inmunológica durante la COVID19 en humanos. El establecimiento del modelo animal usando la cepa MA15 nos permitirá complementar dichos estudios y estudiar en mayor profundidad la eficacia de esta vacuna y el mecanismo implicado. Estos resultados se validarán posteriormente en un modelo de ratón que exprese ACE2 humano usando el virus SARS-CoV-2. Para ello se realizarán ensayos de patogenicidad y protección en ratones convencionales Balb/c, y C57Bl/6 frente a la infección con la cepa adaptada a ratón rSARS-CoV-MA15, desarrollada en el laboratorio del Profesor Luis Enjuanes. Los ratones Balb/c, y C57Bl/6 son susceptibles a la infección viral, y mimetizan la enfermedad pulmonar severa observada en humanos, causando



patología y una alta letalidad. Con el fin de analizar la respuesta inmunológica frente a la infección, así como su implicación en los mecanismos de protección activados por las vacunas BCG y MTBVAC, también se utilizarán otras cepas de ratón.

Duración prevista de la actividad:

Teniendo en cuenta los proyectos activos junto con las nuevas solicitudes que se van a presentar se estima una duración de aproximadamente 5 años. (noviembre 2020 a diciembre 2025)

(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 I 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

a) Organismo receptor:

El organismo receptor es un virus recombinante SARS-CoV que contiene la delección de dos nucleótidos para su identificación generado tal y como se describe en (Fett et al. J Virol. 2013 Jun;87(12):6551-9).

El OMG es 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 wt (SARS-CoV) produce enfermedad respiratoria severa en seres humanos

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

Se espera que sea patógeno para humanos, dado que el virus wt (SARS-CoV) produce enfermedad respiratoria severa en seres humanos

2) Efectos para el medio ambiente.

El OMG no existe en la naturaleza, se generó en el laboratorio y en todo momento permanecerá confinado dentro de las instalaciones. El virus silvestre generó un brote iniciado en China en noviembre de 2002 que la OMS declaró concluido en agosto de 2003. Desde entonces no se ha detectado su presencia en la población humana. Es un virus zoonótico, siendo su origen el murciélago y las civetas que actuaron como animal hospedador intermedio. Este virus, aunque son patógenos para humanos, no causan enfermedad en los animales hospedadores intermedios.

Si accidentalmente se propagara por el aire, podría ser patógeno para humanos.



1) 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

2) 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).

Las infecciones se van a llevar a cabo en un box de experimentación (laboratorio indicado en la solicitud) dotado de todos los equipos científicos necesarios (CBS, rack ventilado, congeladores y ultracongelador, incubadores, etc), a fin de minimizar al máximo los riesgos fuera de esa área. Los animales se alojan en racks ventilados que cumplen con las medidas de seguridad, presión negativa, filtros HEPA, conexión a grupo electrógeno. Dicha sala dispone también de cabinas de seguridad adecuadas (Clase II) para la infección de los animales.

Los virus una vez titulados los se enviarán al animalario de nuestro centro donde se almacenará en los ultracongeladores. Los envíos se llevarán a cabo mediante una empresa especializada en transporte de mercancía peligrosa y con experiencia en el sector del envío de material biológico infecciosos tipo A, utilizando un contenedor de triple envase, siguiendo los protocolos establecidos.

El acceso al animalario únicamente será posible al personal autorizado. El acceso se realiza a través de esclusa, con puertas estancas, y previa identificación. Existen vestuarios interiores para limpio/sucio

Se incluyen las siguientes instalaciones:

Ducha de descontaminación y protocolo de descontaminación química.

Vigilancia de los habitáculos y en del box mediante ventana de observación

Doble filtración HEPA en el aire de extracción

Filtración en el aire de impulsión

Tratamiento de efluentes.

Suministro eléctrico independiente para la instalación, y grupo electrógeno para equipos.

Control de parámetros de biocontención de la instalación, conectado a sistema de alarma

Para la toma de muestra y manipulación de animales se dispone de Cabinas de Seguridad Biológica Clase II, y rack ventilado para el aislamiento de los ratones



La cabina se valida anualmente, y se verifica su funcionamiento antes de cada experimento.

La Universidad, por medio de su servicio de prevención, ha actualizado este año el plan de autoprotección del edificio, contemplando las posibles emergencias y planes de evacuación.

- b) Concentración y escala utilizadas.

Para cada ensayo, se utilizará 30 ul por animal, con una concentración estimada de entre 1×10^3 y 1×10^7 ufp/ml

- 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 virus llegará a nuestras instalaciones, desde el laboratorio de origen y no será necesario su cultivo.

El uso de ratones dentro del rack ventilados y del box donde se ubica, con sus medidas de seguridad impedirán que estos ratones se liberen al medio ambiente

- 3) Determinación de la clasificación y medidas de confinamiento definitivas y confirmación de su idoneidad:

Grado 3, para actividad de riesgo en condiciones de confinamiento tipo 3

- 4) Determinación del riesgo en el caso de que se produzca una liberación accidental:

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

El CIEETE donde se ubica el animalario, es un edificio independiente, aunque está ubicado dentro de un Campus Universitario, con edificios de aulas y servicios cercano. El edificio cuenta con instalaciones destinadas a Administración fuera de la zona de contención.

Zaragoza está situado en el centro del valle del Ebro. Temperaturas calurosas en verano, llegando a alcanzarse hasta los 40° en días puntuales, y frío ligero en invierno, llegando a mínimas de -2 -3°C puntualmente. Viento a rachas con una frecuencia del 40% y una velocidad media de 30km/hora.

- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente. Ver anexo
- c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales. Ver anexo
- d) Planes de emergencia. Adjuntamos documento “plan de emergencias Edificio Encefalopatías, Fac. Veterinaria. Universidad de Zaragoza Ver anexo 3.