



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

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

Cargo: Director del CNB

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Marta López de Diego

Cargo: Investigadora Principal

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

Nombre y apellidos: Fernando Usera Mena

Cargo: Responsable del Servicio de Seguridad Biológica y Protección Radiológica

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

Fernando Usera Mena



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

SI NO

La actividad recibe financiación del CSIC, plataforma PTI Salud Global, Referencia: 202020E086.

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

-Nombre de la convocatoria:

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

-Organismo financiador:

- 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*).

Esta actividad se realizará utilizando la infraestructura de contención del laboratorio NCB2 nº 10 del Centro Nacional de Biotecnología, con número de referencia del expediente: A/ES/18/I-08.

a) Fecha de ~~comunicación~~ / autorización de la instalación: Julio 2018

b) Número de referencia del expediente: A/ES/18/I-08

La actividad de utilización de los OMG generados (células knock-out) para ser infectadas con SARS-CoV-2 se realizará utilizando la infraestructura de contención del laboratorio NCB3 nº 150 del Centro Nacional de Biotecnología, con número de referencia de expediente: A/ES/00/I-08 y fecha de autorización de la instalación: 15/03/2001.

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.



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

Introducción de deleciones de nucleótidos en las secuencias codificantes para las proteínas IFI6, IFI27, OAS1, OAS2, OAS3, SLC6A20, XCR1, CCR1, y CXCR6 en las células A549 (células humanas epiteliales procedentes de adenocarcinoma pulmonar) para generar células knock-out para estos genes y para analizar el efecto de estos genes en la replicación y en la inducción de respuestas inmunes innatas en células infectadas con el virus de la gripe y coronavirus (SARS-CoV-2).

2) Clasificación de la actividad:

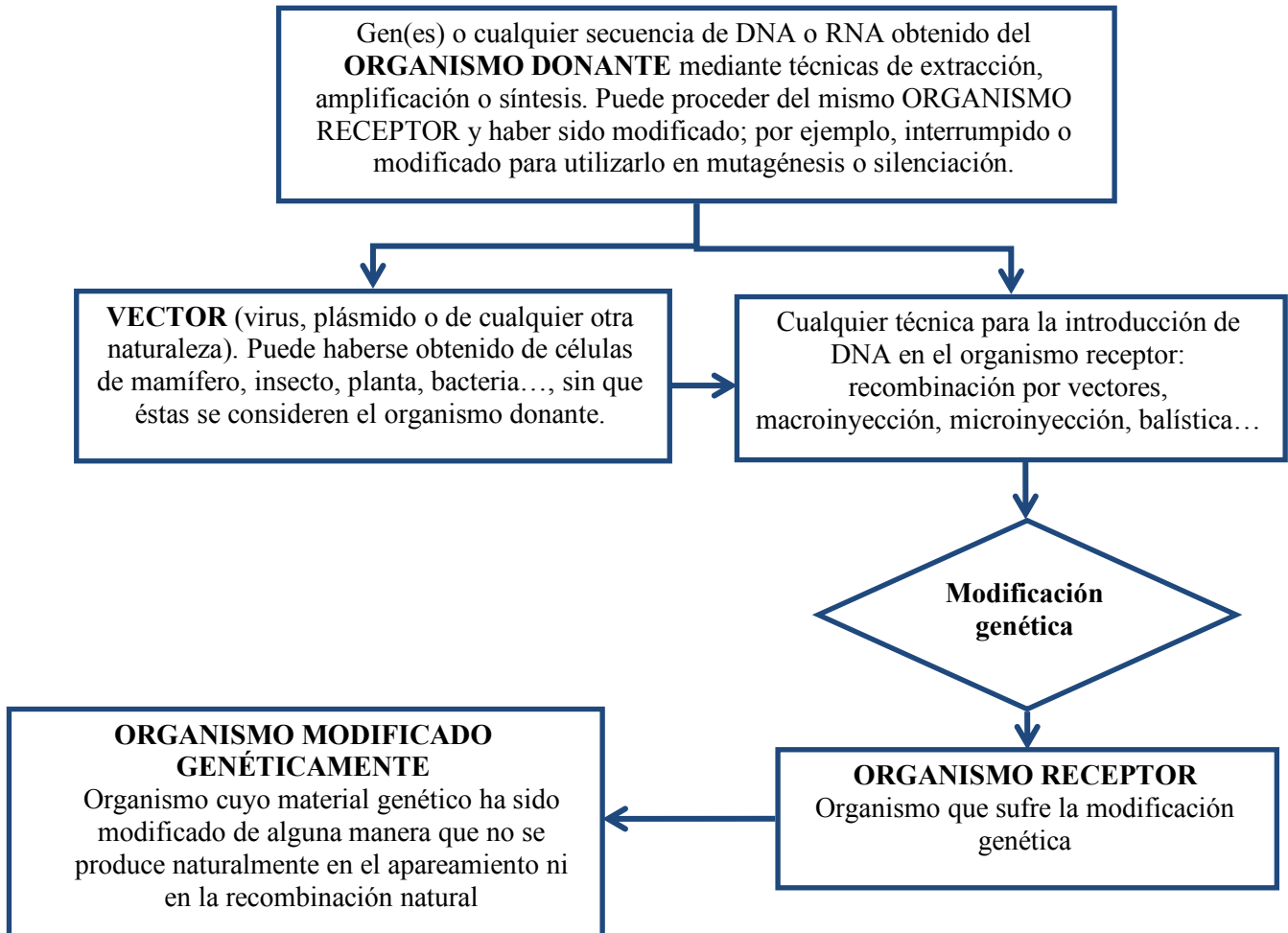
(Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y el anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente, y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

Aunque las modificaciones genéticas que se van a realizar sobre la línea celular A549 se clasifican como ACT tipo 2, dado que van a utilizarse para ser infectadas por el coronavirus SARS-CoV-2 se clasificarán como ACT tipo 3.



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: células humanas A549

Taxonomía: células de la especie *Homo sapiens*

Nombre común: Células A549 epiteliales derivadas de un carcinoma de pulmón humanas

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

Células establecidas altamente empleadas en los laboratorios. Proceden de un carcinoma de pulmón de un hombre de 58 años (https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-185.aspx?geo_country=es)

b) Técnicas de identificación:

No aplica

c) Marcadores genéticos:

No aplica

d) Marcadores fenotípicos:

No aplica

e) Estabilidad genética:

No aplica

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

Ninguna

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI

NO

Las células A549 proceden de la “American Type Culture Collection (ATCC)” y están clasificadas como nivel 1 de bioseguridad. En la hoja de seguridad de esta línea celular se indica que “no se conoce que esta línea celular cause enfermedad en humanos”. Aún así, esta línea celular se manejará siempre dentro de la cabina de bioseguridad en el laboratorio de contención biológica de nivel 2.

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:

Las células no se consideran patógenas.



- 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.*):

Agente biológico no patógeno, la línea celular humana es asimilada al Grupo de Riesgo 2 de patógenos humanos.

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

SI NO

Porqué:

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

Las células A549 proceden de la American Type Culture Collection (ATCC) y están clasificadas como nivel 1 de bioseguridad estando libre de agentes biológicos contaminantes. En la hoja de seguridad de esta línea celular se indica que “no se conoce que esta línea celular cause enfermedad en humanos”.

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

Esta línea celular es muy común en muchos laboratorios, sin detectarse ningún problema de seguridad asociado a su uso. La investigadora principal lleva usando esta línea celular 8 años, sin haber detectado ningún problema de seguridad.

- 9) Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:

- a) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?:

No

En caso afirmativo:

- b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo: **No aplica**

- 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: **No aplica**
- d) Posibles nichos ecológicos: **No aplica**
- 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*):

Ninguno

- b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Ninguno

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

El organismo receptor son células, que solo se encuentran en cultivo en los laboratorios.

12) Hábitat natural del organismo:

Ninguno, estas células solo están en el laboratorio.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

No existe 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:

La modificación genética se lleva a cabo para que las proteínas codificadas por los genes IFI6, IFI27, OAS1, OAS2, OAS3, SLC6A20, XCR1, CCR1, y CXCR6 no se expresen en las células (generación de células knock-out). El objetivo final es determinar si estos genes afectan de algún modo la replicación y la inducción de las respuestas inmunes innatas después de las infecciones con el virus de la gripe y SARS-CoV-2, comparando estos parámetros en las células parentales infectadas y en las células knock-out infectadas. Se generará una línea celular knock-out para cada gen.

Los genes IFI6 e IFI27 son genes cuya expresión se induce por interferón y regulan la apoptosis celular (Cheriyath et al. J. Clin. Invest. 2007; 117(10):3107-17; Rosebeck et al. Apoptosis. 2008; 13(4):562-72).

Los genes OAS1, OAS2 y OAS3 también son genes cuya expresión se induce por interferón y tienen actividad antiviral, dado que activan la proteína RNasaL. La proteína RNasaL degrada los RNAs virales y celulares, inhibiendo por tanto la síntesis de proteínas (Kristiansen et al. J. Interferon Cytokine Res. 2011; 31(1):41-7).

El gen SLC6A20 codifica una proteína que interacciona con la proteína ACE-2, que es una de las proteínas a las que el SARS-CoV-2 se une para entrar en las células (Kuba et al. Pharmacol. Ther. 2010;128:119–128).



Los genes XCR1, CCR1 y CXCR6 codifican para receptores de quimiocinas y participan en procesos inflamatorios (Bathia et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2012; 46(5): 566–572).

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

Generar líneas celulares en las que se delecionarán nucleótidos en las fases de lectura abiertas de cada gen en estudio. Para ello, las células A549 se transfectarán con el plásmido pX330 que expresa el gen de la caspasa 9 y un RNA guía específico para cada gen que se quiere delecionar. Este RNA guía será complementario a la secuencia de cada gen que se quiere noquear. Una vez que se transfecte el plásmido en las células, el RNA guía producido hibridará con el gen a noquear, y la caspasa 9 producirá un corte en el material genético, delecionará unos nucleótidos, y la maquinaria de reparación de DNA celular volverá a ligar el material genético cortado. A continuación, las células se plaquearán muy diluídas y se seleccionarán clones de células individuales para genotiparlos. Las células que hayan introducido delecciones en los genes de interés se crecerán y se congelarán stocks de las mismas.

Todo este proceso se realizará en la cabina número 7, y en el incubador número 5, del laboratorio NCB2 nº 10.

A continuación, las células parentales y las células knock-out para cada gen se infectarán con el virus de la gripe (cepa A/California/04/2009) o con el coronavirus SARS-CoV-2.

Las infecciones con el virus de la gripe se realizarán en el laboratorio NCB2 nº 10, en la cabina número 7, y en el incubador número 5.

Las infecciones con SARS-CoV-2 se realizarán en el laboratorio NCB3 nº 150.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

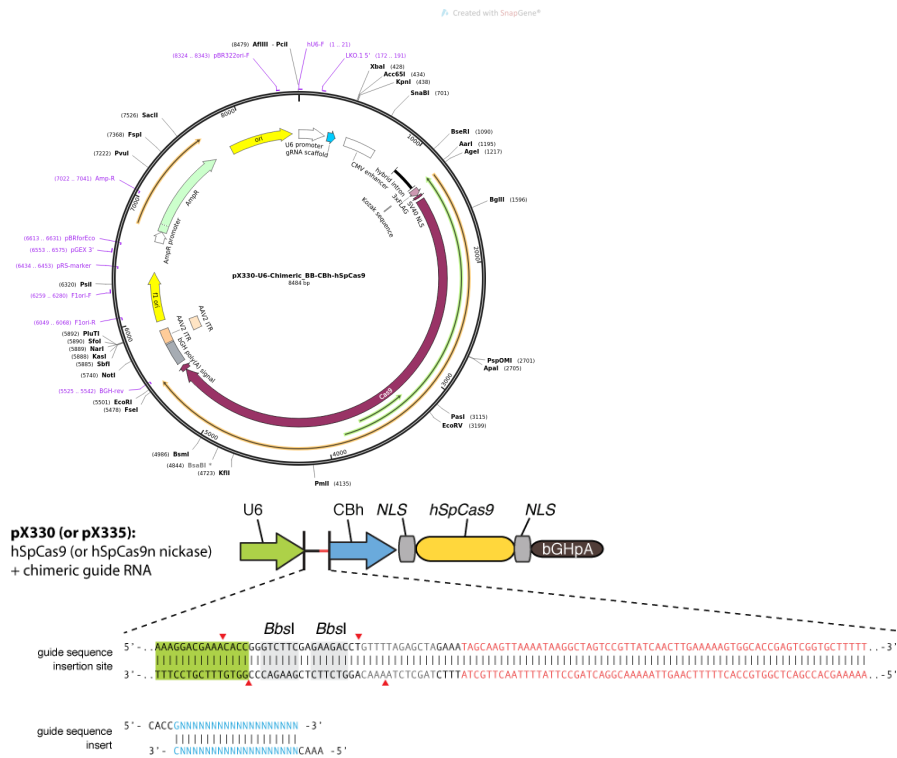
Plásmido px330

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 plásmido codifica en gen de resistencia al antibiótico ampicilina (Amp) para seleccionar las bacterias en las que se ha introducido el plásmido mediante el crecimiento de las bacterias en medio con ampicilina. El plásmido codifica el gen de la caspasa 9 (cas9), orígenes de replicación en bacterias (f1 ori) y un sitio de clonaje con BbsI para introducir la secuencia de cDNA de los RNAs guías que se expresarán en la células eucariota bajo el control del promotor U6.



d) Gama de hospedadores del vector:

El plásmido solo replica en las bacterias en las que deliberadamente se introduce el plásmido.

e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

Ninguno

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

El vector no es un bacteriófago

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

No

5) Información del inserto:

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

El inserto son secuencias complementarias a los genes que se quieren deletar de unos 20 nucleótidos. Se utilizarán dos secuencias complementarias para cada gen, que se clonarán en el plásmido pX330.

Las secuencias de los insertos complementarias a cada gen que se quiere deletar son las siguientes:



IFI6: CTGACCTTCATGGCCGTCGG
IFI27: TGCCATGGGCTTCACTGCGG
OAS1: GTACGAAGCTGAGCGCACGG GGG
OAS2: GTCTTAAGAGGCAACTCCGA TGG
OAS3: CCTCAAGATCTACGGATGTC AGG
SLC6A20: GGGAATGCCGCTCTTGTACC TGG
XCR1: AGAGGGGGCTCACTACCGAC AGG
CCR1: CAACTTGTAGTCGATCCAGA AGG
CXCR6: TCACCAGGAACACATCCGTC AGG

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

Las secuencias, de 20 nucleótidos serán complementarias a los genes IFI6, IFI27, OAS1, OAS2, OAS3, SLC6A20, XCR1, CCR1, y CXCR6 que se quieren deletar. Estas secuencias se sintetizarán químicamente y se introducirán en el plásmido usando enzimas de restricción.

Estas secuencias servirán para sintetizar los RNAs guías en las células, que hibridarán con los genes IFI6, IFI27, OAS1, OAS2, OAS3, SLC6A20, XCR1, CCR1, y CXCR6.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Transfección en las células A549 del plásmido que codifica los RNAs guía para cada gen que se quiere noquear y la caspasa 9.

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

Ninguno

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

Ninguno

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

El inserto se secuenciará completamente una vez que se hayan generado los plásmidos.

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?

El material genético será un plásmido, que al no integrarse en el material genético de las células se irá perdiendo a medida que las células se dividan. El plásmido codifica los RNAs guía complementarios a la secuencia de cada gen que se quiere noquear. Una vez que se transfecte el plásmido en las células, el RNA guía producido hibridará con el gen a noquear, y la caspasa 9 (codificada en el plásmido) producirá un corte en el material genético, delecionará unos nucleótidos, y la maquinaria de reparación de DNA celular volverá a ligar el material genético cortado.

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?:

No

En caso afirmativo:

i) número de copias:

ii) localización cromosómica:

iii) secuencias colindantes

iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?:

c) Si se trata de un virus:

No aplica

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.

Las células knock-out no se han generado todavía. Una vez que se generen se analizará la modificación genética mediante PCR y secuenciación. Además, se comprobará que la proteína no se expresa mediante Western blot.



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

- a) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese:

No

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

No

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

El organismo receptor, y el OMG son células humanas, no patógenas para ningún organismo. El vector utilizado para la delección de nucleótidos (plásmido pX330) tampoco es patógeno. No se prevé ningún efecto para la salud humana, animal, ni vegetal ni ningún efecto para el medio ambiente.

- d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:

No es diferente, no se esperan cambios sobre el medio ambiente. Las células no son capaces de crecer fuera de las condiciones de cultivo en las que se mantienen en los laboratorios.

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

No

- f) Marcadores específicos del OMG:

El OMG (células knock-out) solo difiere de las células parentales en la delección de nucleótidos en los genes IFI6, IFI27, OAS1, OAS2, OAS3, SLC6A20, XCR1, CCR1, y CXCR6.

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

El inserto no se integra en el OMG. Las secuencias introducidas en el plásmido servirán para sintetizar los RNAs guías en la célula. El RNA guía producido hibridará con el gen a noquear, y la caspasa 9 (codificada en el plásmido) producirá un corte en el material genético, deleccionará unos nucleótidos, y la maquinaria de reparación de DNA celular volverá a ligar el material genético cortado. Este proceso es comúnmente conocido como sistema de generación de células knock-out mediante la técnica de CRISPR/caspasa9.

El OMG se mantendrá estable genéticamente después de que las células se dividan. Las delecciones de nucleótidos se mantendrán con los clones de las células.



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

Ninguna

5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Secuenciación de las regiones en las que se introducen las deleciones de nucleótidos. Western blot para verificar que las proteínas codificadas por los genes en los que se han introducido deleciones ya no se expresan.

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

El OMG no estará en el medio ambiente, solo en las placas de cultivo que se mantendrán en las instalaciones NCB2 (cuando las células estén infectadas con el virus de la gripe) o NCB3 (si las células se infectan con SARS-CoV-2).

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:

Las células modificadas genéticamente se crecerán adheridas a placas de cultivos celulares. Como máximo se manejarán células en 5 placas de 100 mm de diámetro cada vez, equivalentes a 1×10^7 células en 10 ml por placa (total 5×10^7 células en 50 ml).

b) Número de plantas:

c) Número de animales:

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).

2 años



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

Se generarán células knock-out para que los genes IFI6, IFI27, OAS1, OAS2, OAS3, SLC6A20, XCR1, CCR1, y CXCR6 no se expresen en las células. El objetivo final es determinar si estos genes afectan de algún modo la replicación y la inducción de las respuestas inmunes innatas después de las infecciones con el virus de la gripe y SARS-CoV-2, comparando estos parámetros en las células parentales infectadas y en las células knock-out infectadas. Se generará una línea celular knock-out para cada gen.

- 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:

Las células knock-out (OMG) se generarán a partir de las células parentales A549. Estas células parentales A549 ya están en el CNB.

- 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*):

No aplica

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

Las células se crecerán adheridas a placas de cultivos celulares. Como máximo se manejarán células en 5 placas de 100 mm de diámetro cada vez, equivalentes a 1×10^7 células en 10 ml por placa (total 5×10^7 células en 50 ml).

Una vez que se hayan generado las células knock-out, se infectarán con el virus de la gripe (en el laboratorio NCB2 nº 10) y con SARS-CoV-2 (en el laboratorio NCB3 nº 150). En estos casos, las células se crecerán adheridas a las placas de cultivo y nunca se manejarán volúmenes superiores a 20 ml (2×10^7 células). Los inóculos de los virus que se usarán para

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) nº 1/2005** del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas 64/432/CEE y 93/119/CE y el Reglamento (CE) nº 1255/97.
- **Reglamento (CE) nº 1946/2003** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente [Diario Oficial L 287 de 5.11.2003].
- **Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad**. Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: <https://bch.cbd.int/protocol/>



infectar las células contendrán unas 10^7 unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml) y no se usarán más de 3 ml en cada experimento.

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

Todos los residuos biológicos que se generen serán inmediatamente inactivados dentro de los recintos de contención (cabinas de bioseguridad) mediante la utilización de germicidas de amplio espectro usados en rotación. Posteriormente, los residuos líquidos ya inactivados se enviarán a la planta de tratamiento de efluentes líquidos del laboratorio y los sólidos se autoclavarán. Los procedimientos de autoclavado y esterilización por calor en la planta “Biowaste” se han validado previamente y se validarán periódicamente mediante la utilización de kits de esporas del microorganismo testigo *Bacillus stearothermophilus*. Estas validaciones se han realizado a nivel interno (servicio de bioseguridad del CNB) y a nivel externo (empresas especializadas en validaciones de estos sistemas). Para mayor información remitirse a la solicitud de autorización de la instalación.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

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

- El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.
- Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por esta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Bioseguridad validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.
- La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de seguridad biológica. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.



- La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.
- Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma “in situ” y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.
- El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.
- El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.
- No existen zonas residenciales cercanas al CNB.
- No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos, fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista:

Las modificaciones genéticas que se van a realizar sobre la línea celular A549 y las infecciones con el virus de la gripe se clasifican como ACT tipo 2. Esta actividad se realizará utilizando la infraestructura de contención del laboratorio NCB2 nº 10 del Centro Nacional de Biotecnología, con número de referencia del expediente: A/ES/18/I-08 de fecha de autorización de la instalación: Julio 2018

Las actividades realizadas con el virus SARS-CoV-2 clasificadas como ACT tipo 3, se realizarán en uno de los tres sub-laboratorios del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica con autorización del 7/03/01; número de notificación: A/ES/00/I-8 .

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas a seguir serán las expuestas en el reglamento de funcionamiento del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica incluido en la solicitud de autorización.



Las normas del laboratorio NCB2 nº 10 están en el Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios, Sección Seguridad Biológica, Apartado 3 y 4.

2) Formación del personal adscrito:

El personal adscrito ha recibido la formación e información indicada en “Descripción de la información suministrada a los trabajadores”, apartado que se adjuntó a la documentación para la solicitud de autorización del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica.

Todo el personal implicado tiene experiencia en la manipulación de los agentes biológicos que se indican en esta solicitud y su formación académica es licenciatura o doctorado.

La formación del personal específica del laboratorio NCB2 está especificada en el Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios, Sección Gestión en Prevención y Protección Apartado 7.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Para el laboratorio NCB3 viene descrito en el apartado 6.F del reglamento de funcionamiento de la instalación que se incluyó en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

Para los laboratorios NCB2 está descrito en el Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios, Sección Seguridad Biológica, Apartado 4.4 (procedimientos especiales).

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

Para el laboratorio NCB3 vienen descritos en los apartados 6.B, 6.C, 6.D y 6.G. del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

Para los laboratorios NCB2 están descritos en el Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios, Gestión en Prevención y Protección, Apartado 8.

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Para el laboratorio NCB3 vienen descritos en el apartado 6.D. del Reglamento de funcionamiento de la instalación y más específicamente en “Procedimientos y planes de comprobación de la eficacia permanente de las medidas de confinamiento”. Esta información se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio. Además el servicio de seguridad biológica velará por el cumplimiento de las normas de control de acceso, manipulación, descontaminación, esterilización, sanitización, etc. según se indica en diferentes apartados del citado Reglamento.

Para los laboratorios NCB2 están descritos en el Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios, Gestión en Prevención y Protección, apartado 5, Subapartado 2.2.3 (funciones del Servicio de Bioseguridad).



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:

INTERLUM

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

Todo lo concerniente a la gestión de los residuos generados en el laboratorio NCB3 se especifica en los apartados 4.F y 6.H del Reglamento de funcionamiento de la instalación que se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

Todo lo concerniente a la gestión de los residuos generados en los laboratorios NCB2 se especifica en el Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios, Sección Seguridad Biológica, apartado 4.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Para el laboratorio NCB3 vienen indicadas en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

Todo lo referente a actuación en caso de accidente biológico en los laboratorios NCB2 se recoge en el Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios, Sección Seguridad Biológica, apartado 7.

Además, el Centro dispone del Plan de emergencias y evacuación dentro del Plan de Autoprotección del CNB.

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Para el laboratorio NCB3 viene indicado en el Plan de emergencias y evacuación incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio.

Los equipos de protección individual disponibles en los laboratorios NCB2 se especifican en el Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios, Gestión en Prevención y Protección, apartado 8.



El equipamiento disponible en caso de accidente biológico está indicado en la Sección Seguridad Biológica , apartados: 4.4 y 7 del Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios.

Además, el Centro dispone del Plan de emergencias y evacuación dentro del Plan de Autoprotección del CNB.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Documentación:

- Manual de Seguridad e Higiene en los laboratorios del CNB.
- Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.
- Procedimientos Normalizados de Trabajo del Servicio de Bioseguridad del CNB.

Cursos y seminarios:

- Seminarios generales sobre normas de seguridad frente a agentes biológicos, químicos y radiactivos impartido por el Servicio de Bioseguridad del CNB.
- Seminarios específicos sobre el Reglamento de Funcionamiento y Plan de Emergencias del laboratorio de cultivos “in vitro” de nivel 3 de contención biológica del CNB.

4) Planes de emergencia:

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

Además, el Centro dispone del Plan de emergencias y evacuación dentro del Plan de Autoprotección del CNB.



**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

Cargo: Director del CNB

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Marta López de Diego

Cargo: Investigadora Principal

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

Nombre y apellidos: Fernando Usera Mena

Cargo: Responsable del Servicio de Seguridad Biológica y Protección Radiológica

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

Fernando Usera Mena



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:

Introducción de deleciones de nucleótidos en las secuencias codificantes para las proteínas IFI6, IFI27, OAS1, OAS2, OAS3, SLC6A20, XCR1, CCR1, y CXCR6 en las células A549 (células humanas epiteliales procedentes de adenocarcinoma pulmonar) para generar células knock-out para estos genes y para analizar el efecto de estos genes en la replicación y en la inducción de respuestas inmunes innatas en células infectadas con el virus de la gripe y coronavirus (SARS-CoV-2).

2) Duración prevista de la actividad:

2 años

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

III. EVALUACIÓN DE RIESGO

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

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

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

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

a) Organismo receptor.

El organismo receptor son las células A549 de pulmón humanas, que no cuentan con propiedades nocivas

b) Organismo donante.

Ninguno



- c) Inserto.
Las secuencias complementarias a los genes IFI6, IFI27, OAS1, OAS2, OAS3, SLC6A20, XCR1, CCR1, y CXCR6, estas secuencias de nucleótidos no tienen propiedades nocivas
- d) Vector.
El vector usado para generar las células knock-out es el plásmido px330, sin propiedades nocivas.
- e) Organismo modificado genéticamente resultante.
Células A549 knock-out para los genes IFI6, IFI27, OAS1, OAS2, OAS3, SLC6A20, XCR1, CCR1, y CXCR6. No se espera que la delección de estos genes sea nocivo para las células. Asimismo las células knock-out generadas no tienen propiedades nocivas
- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.
El organismo receptor, y el OMG son células humanas, no patógenas para ningún organismo. El vector utilizado para la delección de nucleótidos (plásmido pX330) tampoco es patógeno. No se prevé ningún efecto nocivo para la salud humana, animal, ni vegetal ni ningún efecto para el medio ambiente
- g) Efectos para el medio ambiente.
No se prevé ningún efecto nocivo para el medio ambiente

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 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 2 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 3 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Tipo 4 | <input type="checkbox"/> |

Aunque las modificaciones genéticas que se van a realizar sobre la línea celular A549 se clasifican como ACT tipo 2, dado que van a utilizarse para ser infectadas por el coronavirus SARS-CoV-2 se clasificarán como ACT tipo 3.



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 los laboratorios de contención de nivel 2 y 3, por lo que el organismo modificado estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo. El riesgo de inoculación accidental las células knock-out es prácticamente nulo debido a la ausencia de material punzante y cortante en los laboratorios de nivel 2 y 3 de contención biológica y no hay riesgo de contagio por contacto.

b) Concentración y escala utilizadas.

Las células se crecerán adheridas a placas de cultivos celulares. Como máximo se manejarán células en 5 placas de 100 mm de diámetro cada vez, equivalentes a 1×10^7 células en 10 ml por placa (total 5×10^7 células en 50 ml).

Una vez que se hayan generado las células knock-out, se infectarán con el virus de la gripe (en laboratorios NCB2) y con SARS-CoV-2 (en laboratorios NCB3). En estos casos, las células se crecerán adheridas a las placas de cultivo y nunca se manejarán volúmenes superiores a 20 ml (2×10^7 células). Los inóculos de los virus que se usarán para infectar las células contendrán unas 10^7 unidades formadoras de placa por ml (UFP/ml) y no se usarán más de 3 ml en cada experimento.

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 OMG son células knock-out que se crecerá adheridas a placas de cultivo. Las células knock-out no pueden sobrevivir fuera de las condiciones en las que se cultivan.

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

Actividad confinada de Tipo 3.

La actividad de producción de células knock-out y de infección con el virus de la gripe se realizará en el laboratorio de actividad confinada tipo 2. Actividad en la cual el grado 2 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

La infección de las células con SARS-CoV-2 se producirá en el laboratorio de actividad confinada tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.



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

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

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

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

- El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, resaltándose el sistema de tratamiento de aire y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos. Es más, consideramos que el nivel de contención obtenido excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.
- Estos medios e infraestructura ya se han validado previamente por una empresa externa y serán validados por ésta empresa u otras anualmente o tras averías. Igualmente, el servicio de Bioseguridad validará periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.
- La instalación dispone de un completo reglamento de funcionamiento donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, tanto para el personal usuario como para el propio servicio de bioseguridad. Con ello se pretende realizar una gestión integral en Bioseguridad. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMG, limpieza y sanitización de zona, esterilización e inactivación biológica se encuentran protocolizados por escrito y se dispone de programas de actuación para aquellos procedimientos en que sea conveniente.
- La instalación dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.
- Tanto el laboratorio, como las instalaciones que aseguran las necesarias medidas de contención secundaria, disponen de variados medios de alarma “in situ” y en la consola de control central del edificio ante la ruptura accidental de las barreras de contención secundaria.
- El índice de ocupación de las dependencias cercanas al laboratorio es muy bajo al tratarse de servicios de apoyo a la investigación o de laboratorios de técnicas especiales de uso común. No hay ningún laboratorio con un grupo de investigación anexo a la instalación.
- El Centro Nacional de Biotecnología (CNB) se encuentra enclavado en una zona relativamente nueva del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid. Esta zona se caracteriza por la amplitud existente entre los edificios que la constituyen, fundamentalmente otros centros de investigación.
- No existen zonas residenciales cercanas al CNB.



- No existen en las cercanías cultivos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza, o zonas naturales protegidas o con especial interés ecológico.

b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

Vienen indicadas en el Plan de emergencias y evacuación del CNB incluido en la documentación correspondiente a la solicitud del laboratorio. Así como en el Plan de Emergencias del laboratorio NCB3.

Todo lo referente a actuación en caso de accidente biológico se recoge en el Manual de Seguridad e Higiene en los Laboratorios del CNB, Sección Seguridad Biológica, apartado 7.

Además, el Centro dispone del Plan de emergencias y evacuación dentro del Plan de Autoprotección del CNB

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

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

Los equipos de protección individual disponibles en los laboratorios NCB2 se especifican en el Manual de Seguridad e Higiene en los Laboratorios del CNB, Sección Prevención y Protección, apartado 8.

El equipamiento disponible en caso de accidente biológico está indicado en Manual de Seguridad e Higiene en los Laboratorios del CNB, Sección Seguridad Biológica, apartados: 4.4 y 7

Además, el Centro dispone del Plan de emergencias y evacuación dentro del Plan de Autoprotección del CNB.

d) Planes de emergencia.

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