



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

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Responsables de la actividad

a. Entidad

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

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

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: José Mario Mellado García

NIF: 13295208N

Cargo: Director del CNB

Tel: 91 585 45 03 / 4852

Correo electrónico: direccion.cnb@csic.es

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Urtzi Garaigorta de Dios

NIF: 20223585F

Cargo: Jefe de grupo

Tel: 915855399

Correo electrónico: ugaraigorta@cnb.csic.es

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

Nombre y apellidos: Fernando Usera Mena

NIF: 00694865-N

Cargo: Responsable del Servicio de Seguridad Biológica y Protección Radiológica

Tel: 91 585 45 41

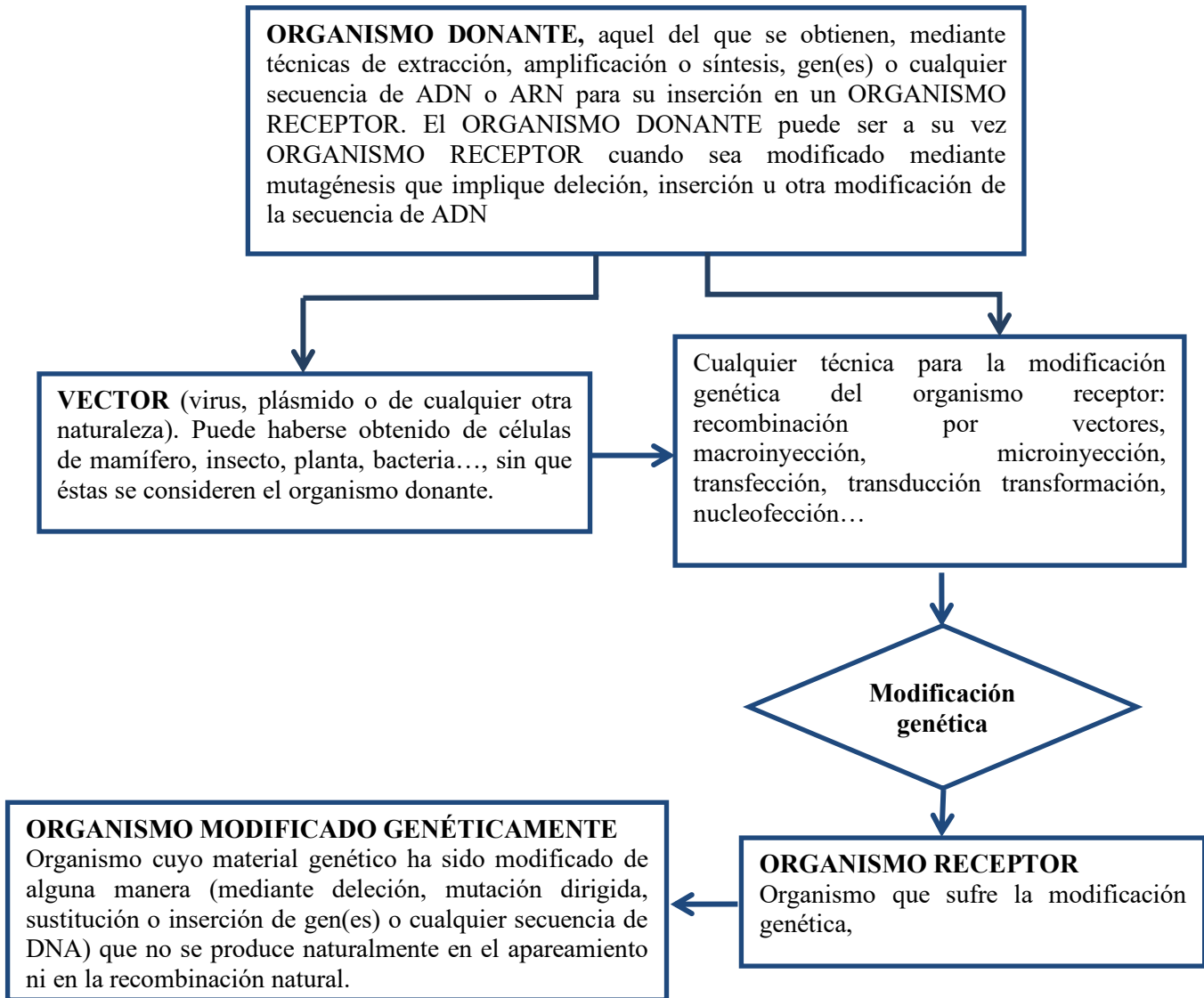
Correo electrónico: fusera@cnb.csic.es

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

Fernando Usera Mena



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





II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

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

SI NO

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

- Nombre de la convocatoria:

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

- Organismo financiador:

Otro tipo de financiación² Las actividades a realizar serán cubiertas por un proyecto intramural especial del CSIC

2. Instalación donde se va a desarrollar la actividad (si la instalación no está autorizada, cumplimente el Formulario Parte B):

- Número de referencia de la notificación de la instalación (A/ES/..I-..):

- Fecha de autorización de la instalación:

Si el OMG no se genera en la instalación³:

- Nombre de la instalación de origen del OMG:

- Número de referencia de la notificación de la actividad en el caso de que se realice en España (A/ES/..../..)

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.

² Se deberá aportar la información que permita verificar esta circunstancia.

³ Debe tenerse en cuenta que, si los OMG proceden de otra instalación española, ésta deberá haber cumplido con los requisitos establecidos en la legislación española de OMG.



- Número de referencia de la notificación de la instalación en el caso de que se ubique en España (A/ES/.../I-...):

- Explicar cómo se realiza el transporte del OMG desde la instalación de origen teniendo en cuenta la legislación aplicable (especificar tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado)⁴:

3. Finalidad de la actividad:

La finalidad de la actividad es completar la evaluación del espectro antiviral de compuestos químicos identificados por nuestro grupo que presentan la capacidad de controlar la propagación de SARS-CoV-2 en cultivo celular. Para ello necesitamos determinar su actividad frente a otros coronavirus patógenos como el MERS-CoV. El Prof. Luis Enjuanes dispone de un virus MERS-CoV generado de manera recombinante que fue autorizado previamente por el Comité Interministerial de OMG (A/ES/13/19). Dicho virus contiene una mutación silenciosa que actúa como marcador genético permitiendo su trazabilidad. Puesto que nuestro objetivo es caracterizar compuestos antivirales que afectan a la replicación viral y/o al funcionamiento de las proteínas virales, la presencia de dicha mutación silenciosa, que no da lugar a cambio alguno en las proteínas virales, en ningún caso puede afectar a las actividades, ni a los resultados ni conclusiones que deriven de estos. Por lo tanto, poder utilizar este virus evitaría tener que generar otro nuevo OMG, cuando científicamente no es necesario para la finalidad de esta actividad. Por último, nos gustaría resaltar que en ningún caso se va a volver a generar dicho OMG, lo único que se solicita es autorización para su utilización para esta nueva actividad.

4. 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 3

Tipo 4

⁴ 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](#). Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE núm. 268, 8.11.2007)
- 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/>
- [Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances](#) Edición bianual de la OMS



III. INFORMACIÓN RELATIVA A LA OBTENCIÓN DEL OMG

1. Organismo receptor del cual deriva el OMG:

- | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Células humanas/primates | <input type="checkbox"/> | Detallar las líneas celulares: |
| Células: otras | <input type="checkbox"/> | Detallar las líneas celulares: |
| Animal | <input type="checkbox"/> | |
| Planta | <input type="checkbox"/> | |
| Bacteria | <input type="checkbox"/> | |
| Hongo | <input type="checkbox"/> | |
| Virus | <input type="checkbox"/> | |
| Protozoos | <input type="checkbox"/> | |

-Especificar el nombre científico y común:

Fragmentos sintéticos de cDNA que codifican la secuencia completa del coronavirus humano responsable del síndrome respiratoria de oriente medio HCoV-SA12 (MERS-CoV).

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i) Técnicas de aislamiento: *Todos los procedimientos que se describen a continuación fueron realizados en el laboratorio del Prof. Luis Enjuanes tras recibir autorización para ello por parte de la Comisión Nacional de Bioseguridad (A/ES/13/19). El cDNA que codifica para el genoma del virus HCoV-SA12-EMC (Ref GenBank JX869059.2) con una mutación silenciosa en el nt 20761 como marcador genético, se generó mediante el clonaje secuencial de 6 fragmentos solapantes obtenidos por síntesis química. Los seis fragmentos solapantes se sintetizaron en la empresa canadiense Bio Basic, Inc. Los fragmentos se clonaron secuencialmente en un cromosoma artificial de bacterias (BAC), que se utilizó como vector y se amplificó en una cepa de bacterias E. coli no patógena. La última etapa del clonaje y el rescate del virus se realizó en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica del CNB. Para aislar el cDNA infectivo, se partió de cultivos de bacterias E.coli. El BAC se obtuvo mediante la purificación del plásmido utilizando el kit large construct de Qiagen. La secuencia completa del genoma de HCoV-SA12 clonada en el BAC contiene todos los marcos de lectura del virus tal y como se indica a continuación: ORF1ab (posición 279 a 21514); ORF2 o S (posición 21456 a 25517); ORF 3 (posición 25532 a 25843); ORF 4a (posición 25852 a 26181); ORF 4b (posición 26093 a 26833); ORF 5 (posición 26840 a 27514); ORF 6 o E (posición 27590 a 27838); ORF 7 o M (posición 27853 a 28512); ORF 8a o N (posición 28566 a 29807); y ORF 8b (posición 28762 a 29100). Los ORF 1a y 1b codifican la replicasa viral. ORF2, codifica la proteína S de la envuelta viral. ORF 6 codifica la proteína E. ORF 7 codifica la proteína M. ORF 8a codifica la proteína N. Los genes estructurales son S, M, N y E. El gen S codifica las espículas del virus, determinantes del tropismo viral. Los genes M y E están implicados en el ensamblaje y salida del virus. El gen N interacciona con el RNA para formar la nucleocápsida. Los genes 3, 4a, 4b, 5 y 8b codifican proteínas específicas de grupo. Estas proteínas, en coronavirus, están generalmente implicadas en contrarrestar las defensas del huésped.*



- ii) Técnicas de identificación: *El BAC que codifica la secuencia del genoma del virus HCoV-SA12, se identificará mediante patrones de restricción y mediante secuenciación*
- iii) Marcadores genéticos: *El marcador genético del BAC es la secuencia correspondiente al genoma del virus HCoV-SA12, con la excepción de una mutación puntual introducida en posición 20761, en la que se ha cambiado una T por una C.*
- iv) Marcadores fenotípicos: *El BAC no presenta ningún marcador fenotípico. El virus recombinante de longitud completa rescatado a partir del BAC producirá efecto citopático en células en cultivo.*
- v) Estabilidad genética: *La estabilidad genética del cromosoma artificial de bacterias (BAC) que se va a utilizar es alta, en el caso de otros coronavirus como SARS-CoV, el BAC permanece estable en bacterias durante al menos 200 generaciones (Almazán et al. J. Virol. 2006).*
- b. La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?
- SI
- Especificar cómo se sabe que está libre de agentes biológicos contaminantes.
- El BAC se crece en bacterias sometidas a selección antibiótica para minimizar la contaminación con bacterias ambientales.
- NO
- Especificar si se conocen o se sospecha cuáles pueden ser.
-
- c. Modificación genética anterior:
- SI
- Describir:
-
- Cambios en virulencia, patogenicidad, tropismo, toxicidad, otros efectos.
-
- NO
- d. Se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos intra/extracelulares (Asignar grupo de riesgo conforme al anexo II de Real Decreto 664/1997 tras evaluación del riesgo específica):
- Los seis fragmentos que codifican la secuencia de HCoV-SA12 no son patógenos, dado que codifican solo parte de la secuencia. El cromosoma artificial de bacterias que codifica para rHCoV-SA12-EMC, no es patógeno en sí mismo. El virus codificado en él se espera que sí que lo sea porque el virus no recombinante del que procede (HCoV-SA12-EMC) sí que produce fallo respiratorio, renal e incluso puede producir la muerte en humanos.*
- SI
- Para:



- Humanos
- Animales
- Plantas
- Otros



– Posibles efectos alérgicos y/o tóxicos (describir):

NO

Los seis fragmentos que codifican la secuencia de HCoV-SA12 no son patógenos, dado que codifican solo parte de la secuencia. El cromosoma artificial de bacterias que codifica para rHCoV-SA12-EMC, no es patógeno en sí mismo. El virus codificado en él sí es un patógeno humano ya porque el virus no recombinante del que procede (HCoV-SA12-EMC) sí que produce fallo respiratorio, renal e incluso puede producir la muerte en humanos.

e. En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI

NO

f. Experiencia previa adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor:

En la última década otros laboratorios de nuestro centro han adquirido amplia experiencia en el manejo de BACs y de virus derivados de dichos BACs, no habiéndose detectado ningún problema de bioseguridad.

g. Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:

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

SI

- Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

esporas

endosporas

quistes

esclerocios

esporas asexuales (hongos)

esporas sexuales (hongos)

otros, especifíquese

NO *Los fragmentos sintetizados y el cromosoma artificial de bacterias (BAC) en el que se clonan los fragmentos sintetizados no son capaces de sobrevivir fuera de las bacterias.*

ii) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

Los fragmentos sintetizados no sobreviven en el medio ambiente. El cromosoma artificial de bacterias es incapaz de sobrevivir fuera de la bacteria que se ha transformado con el mismo

iii) Posibles nichos ecológicos:



Los fragmentos sintetizados no se encuentran en la naturaleza. El cromosoma artificial de bacterias tampoco se encuentra en la naturaleza, solo está en el laboratorio dentro de las bacterias del género E. coli

iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

h. Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

Los fragmentos sintetizados y el plásmido que se va a utilizar no se encuentran en el medio ambiente



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

El cromosoma artificial de bacterias no interacciona con otros organismos ya que está confinado a las bacterias que existen en el laboratorio y es poco probable que salga de él ya que es incapaz de propagarse

i. Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:

Los fragmentos sintetizados y el BAC no se encuentran en la naturaleza ya que han sido generados en el laboratorio del Prof. Luis Enjuanes

j. Hábitat natural del organismo:

No aplica

2. Organismo(s) donante(s). No completar el punto si no existiese organismo donante o si es el mismo que el organismo receptor.

- | | |
|-----------|--------------------------|
| Humanos | <input type="checkbox"/> |
| Animal | <input type="checkbox"/> |
| Planta | <input type="checkbox"/> |
| Bacteria | <input type="checkbox"/> |
| Hongo | <input type="checkbox"/> |
| Virus | <input type="checkbox"/> |
| Protozoos | <input type="checkbox"/> |

-Especificar el nombre científico y común:

Fragmentos sintéticos de cDNA que codifican la secuencia completa del virus HCoV-SA12 (el mismo que el organismo receptor o parental)

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI NO

b. La cepa/línea celular donante: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

SI

– Especificar cómo se sabe que está libre de agentes biológicos contaminantes.

El BAC se crece en bacterias sometidas a selección antibiótica para minimizar la contaminación con bacterias ambientales.

NO

– Especificar si se conocen o se sospecha cuáles pueden ser.

c. Modificación genética anterior:

SI

– Describir:



[]

- Cambios en virulencia, patogenicidad, tropismo, toxicidad, otros efectos.

[]

- d.** Se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos intra/extracelulares. (Asignar grupo de riesgo conforme al anexo II de Real Decreto 664/1997 tras evaluación del riesgo específica):

El virus que deriva del BAC, el MERS-CoV, es un patógeno para los seres humanos.

SI Para:

- | | |
|----------|-------------------------------------|
| Humanos | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Animales | <input type="checkbox"/> |
| Plantas | <input type="checkbox"/> |
| Otros | <input type="checkbox"/> |

- Posibles efectos alérgicos y/o tóxicos (describir):

El virus MERS-CoV causa enfermedad respiratoria grave, fallo renal e incluso la muerte en humanos

NO

- e.** En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI NO

- f.** Tipo de material genético obtenido del organismo donante (gen codificante o fragmento del mismo. miRNA, lncRNA, etc.):

Secuencia completa del virus HCoV-SA12-EMC o MERS-CoV (Ref. GenBank: JX869059.2)

- g.** Método de obtención:

- Extracción
- PCR
- Síntesis *in vitro*

- h.** Función del gen/genes o secuencias en el organismo donante:

Al tratarse de la secuencia completa del virus MERS-CoV, contiene todos los genes necesarios para la completar el ciclo replicativo del virus.

- 3.** ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

No aplica



IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1. Objetivo de la modificación genética (sobreexpresión, silenciamiento, otros):

Generar un virus recombinante derivado de HCoV-SA12-EMC, con la introducción de un marcador genético

2. Tipo de modificación genética:

- Inserción de material genético
- Delección de material genético
- Sustitución de bases
- Otros, especifique:

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

- Transformación
- Electroporación
- Macroinyección
- Microinyección
- Infección
- Transfección
- Fusión celular

Otros, especifique:

Para generar el clon infeccioso que codifica el virus rHCoV-SA12-EMC, se partió de fragmentos de cDNA sintetizados químicamente. Estos fragmentos, se insertaron en un BAC disponible en el laboratorio del Prof. Luis Enjuanes, mediante técnicas de clonaje convencionales

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a. Tipo e identidad del vector (plásmido, virus, otros):

Cromosoma artificial de bacterias (BAC)

- i) Aportar mapa de restricción del vector. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación y cualquier otro elemento presente en el vector.

Mirar documento adjunto.

ii) Si se trata de virus:

- Es defectivo en replicación SÍ NO
- Indicar cómo se obtiene el vector viral. Si se utilizan plásmidos para su obtención aportar mapa de restricción del/los plásmidos. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes.

b. Gama de hospedadores del vector:

Bacterias Escherichia coli

c. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No presenta

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

No aplica

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

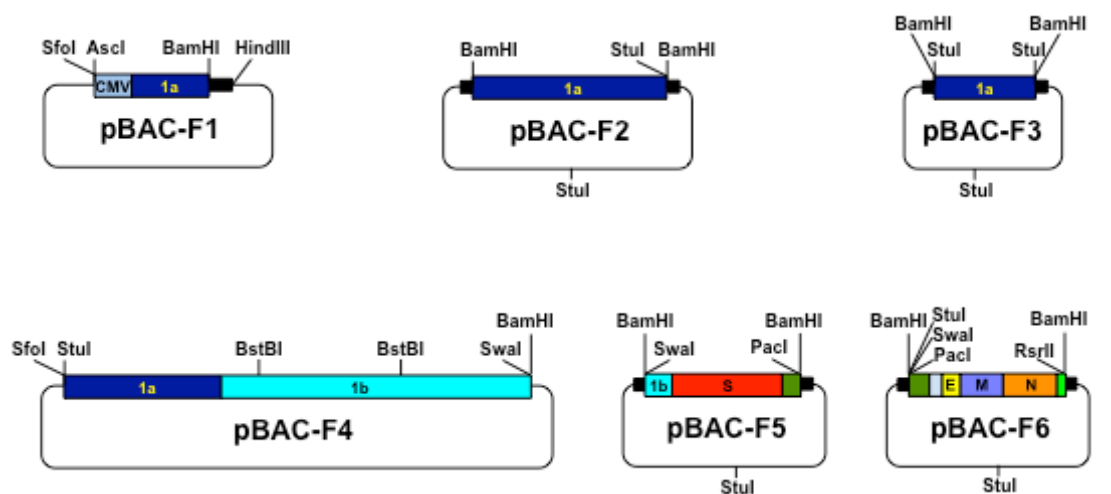
No aplica, porque el BAC siempre se utiliza en bacterias

5. Información de la secuencia insertada, delecionada o modificada.

a. Función específica de cada parte de la secuencia insertada, delecionada o modificada:

El origen y función de los genes de las diferentes cepas son los mismos para todas las cepas y se detallan a continuación:

Los ORF 1a y 1b codifican la replicasa viral. ORF2, codifica la proteína S de la envuelta viral. ORF 6 codifica la proteína E. ORF 7 codifica la proteína M. ORF 8a codifica la proteína N. Los genes estructurales son S, M, N y E. El gen S codifica las espículas del virus, determinantes del tropismo viral. Los genes M y E están implicados en el ensamblaje y salida del virus. El gen N interacciona con el RNA para formar la nucleocápsida. Los genes 3, 4a, 4b, 5 y 8b codifican proteínas específicas de grupo. Estas proteínas, en coronavirus, están generalmente implicadas en contrarrestar las defensas del huésped



El diagrama muestra seis plásmidos (pBAC-F1 a pBAC-F6) con sus respectivos mapas de restricción y genes insertados. pBAC-F1 tiene sitios de restricción SfoI, AclI, BamHI y HindIII, y un gen 1a. pBAC-F2 tiene sitios BamHI, StuI y BamHI, y un gen 1a. pBAC-F3 tiene sitios BamHI, StuI y StuI, y un gen 1a. pBAC-F4 tiene sitios SfoI, StuI, BstBI, BstBI y SwaI, y genes 1a y 1b. pBAC-F5 tiene sitios BamHI, SwaI, BamHI y PacI, y genes 1b y S. pBAC-F6 tiene sitios BamHI, StuI, SwaI, PacI, BamHI y RsrII, y genes E, M y N.



b. Información sobre los genes estructurales:

Los genes estructurales son S, M, N y E.

ORF2, codifica la proteína S de la envuelta viral, que es el determinante del tropismo viral. ORF 6 y 7 codifican las proteínas E y M, respectivamente, que están implicadas en el ensamblaje y salida del virus. ORF 8a codifica la proteína N, que interacciona con el RNA para formar la nucleocápsida.

c. Información sobre los elementos reguladores:

Los insertos contienen las secuencias reguladoras de la transcripción (TRS) tal y como se encuentran presentes en el genoma viral

d. ¿Ha sido secuenciada?

Si, la secuencia se encuentra en el documento adjunto.

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

No

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

No

6. Si se ha utilizado un vector, ¿cuál es su situación final en el OMG?

a. Si el vector es un plásmido

i) Se pierde

ii) Se inserta en el genoma

- Aleatoriamente

- En un sitio definido

o Localización cromosómica:

o Secuencias colindantes:

o La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

iii) Se mantiene en forma episómica

- Número de copias:

El cromosoma artificial de bacterias (BAC) con el que se transformaron las células está presente en 1 o 2 copias por bacteria.

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector



Los BAC en general pueden presentar problemas de estabilidad por lo que en cada producción se realiza una secuenciación para verificar la secuencia completa del mismo.

b. Si el vector es un virus:

i) Se mantiene en forma episómica

ii) Se inserta en el genoma

- La inserción se produce al azar

- La inserción es específica

o Localización cromosómica:

o Secuencias colindantes:

o La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas. Justificar:

El cromosoma artificial de bacterias se utilizó para transfectar células Vero y LLC-MK2 y poder rescatar así virus recombinantes correspondientes al rHCoV-SA12-EMC.

c. Análisis moleculares previstos relativos a la expresión del producto deseado (PCR, Southern, Northern, secuenciación, otros):

i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

ii) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

iii) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)



V. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG)

1. Descripción del OMG final

Los organismos modificados genéticamente (correspondientes al virus recombinante rHCoV-SAI2-EMC completo) son virus recombinantes. Para obtener estos virus, se utilizó un BAC que codifica el genoma de los distintos virus. Este BAC se transfectó en células de mono Vero y LLC-MK2, de las que se obtuvo el virus recombinante. Como se ha comentado anteriormente este proceso se realizó en el laboratorio del Prof. Luis Enjuanes tras recibir la autorización pertinente por la Comisión Nacional de Bioseguridad (A/ES/13/19).

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:

Con respecto a los plásmidos parental y modificados, no son diferentes en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo, ya que ninguno de los dos es capaz de crecer fuera de ellas. En cuanto al virus recombinante generado es capaz de sobrevivir en células en cultivo, y también en humanos.

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

No, ya que la secuencia completa del virus resulta idéntica a la del receptor excepto en un único cambio silencioso que no afecta ni al modo ni a la tasa de reproducción. El ciclo replicativo tanto del OMG resultante como del virus parental es de unas 6-8 horas en cultivo celular, al igual que se ha descrito con otros coronavirus.

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

El virus recombinante rHCoV-SAI2-EMC se espera que produzca enfermedad respiratoria grave y fallo renal en humanos de forma idéntica a lo que ocurre con los virus no recombinantes HCoV-SAI2-EMC. De todas formas, el virus estará confinado dentro del laboratorio de nivel 3 de contención biológica.

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

El virus rescatado no se sacará fuera del P3, por lo que no tendrá ningún efecto sobre el medio ambiente.

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

El virus rescatado se crecerá en células en cultivo en presencia de Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con un 10% de suero bovino fetal.

- f. Marcadores específicos del OMG:



El OMG presentará un cambio de nt en posición 20761 con respecto a un virus silvestre HCoV-SA12-EMC lo que permite trazarlo genéticamente.

3. Información sobre la estabilidad genética previsible del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):

Se prevé que la estabilidad genética del inserto sea alta, aunque podría sufrir algunas modificaciones puntuales en su secuencia en el paso de replicación.

4. Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos. Justificar:

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

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

- a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Las técnicas que se utilizarán para la identificación de OMG serán: Microscopía de fluorescencia mediante anticuerpos específicos de diferentes proteínas del virus HCoV-SA12-EMC; RT-PCR empleando oligonucleótidos complementarios de la secuencia del gen S, E y N del virus HCoV-SA12-EMC.

- b. Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:

El OMG no va a estar en el medio ambiente ya que estará contenido en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica.



VI. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1. Descripción de la actividad. (Breve resumen de los ensayos que se prevén realizar, incluidos los que se llevarán a cabo con el OMG).

La actividad se centra en estudio del potencial antiviral de compuestos químicos frente a virus patógenos humanos incluido el MERS-CoV. Para ello se realizarán infecciones en células susceptibles (Huh7, MRC5) en presencia y ausencia de compuestos antivirales con el virus recombinante MERS-CoV, generado en el laboratorio del Prof. Enjuanes y se estudiará la capacidad de los compuestos para controlar la propagación viral.

2. Información sobre el volumen o cantidad de OMG a utilizar:

- a. Volumen o concentración máxima por ensayo en el caso de microorganismos.

- i) Para preparación de lotes

Se prepararán lotes de virus con un volumen máximo de 40 ml. En todos los casos los virus se manejarán en frascos cerrados, en cultivos que implican volúmenes de medio inferiores a 20 mls. Se utilizarán 2 frascos de 75 ml por ensayo. Los títulos que se generarán con este virus oscilan entre 1×10^6 y 5×10^7 unidades formadoras de placa por ml (ufp/ml). Los virus se pasarán a intervalos de uno a tres días, dependiendo del efecto citopático producido. Todas las manipulaciones se realizarán en el laboratorio de nivel 3 de contención biológica. Se utilizarán equipos de protección individual compuestos por un capuz por el que se hace circular una corriente de aire estéril sobrepresionado. Como es preceptivo, todos los residuos biosanitarios generados se inactivarán en un primer paso en el interior de la cabina de flujo laminar. Posteriormente volverán a ser inactivados mediante autoclave (residuos sólidos) o en la planta de inactivación de efluentes líquidos del laboratorio (residuos líquidos)

- ii) Para Inoculaciones. Método de inoculación *in vitro*/ *in vivo*:

Los lotes de virus se utilizarán para infectar células susceptibles (por ejemplo: Huh7 y MRC5) a multiplicidades de infección entre 10^{-3} y 3 UFP por célula. Tras una hora de incubación con el inóculo viral, éste se retirará, las células se incubarán durante periodos variables de tiempo (entre 2 a 72 horas) dependiendo del experimento en cuestión.

- b. Número aproximado de plantas por ensayo:

No aplica

- c. Número aproximado de animales por ensayo:

No aplica

3. Naturaleza de las operaciones:

- a. Enseñanza
- b. Investigación
- c. Desarrollo

4. 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).

Al menos 5 años

VII. EVALUACIÓN DE RIESGO

Se tendrán en cuenta los elementos y el procedimiento conforme al Anexo I del Real Decreto 178/2004 de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo).

1. Identificar cómo pudieran afectar las posibles propiedades nocivas del organismo receptor, donante, inserto y vector al OMG que se va a generar:

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

- a. Organismo receptor.

El BAC en sí mismo no tiene ningún efecto nocivo, sin embargo, el virus recombinante final, rescatado a partir del mismo sí que produce enfermedad respiratoria grave, así como fallo renal y muerte en los humanos.

- b. Organismo donante.

El organismo donante es igual al organismo receptor por lo que aplican las mismas consideraciones expuestas anteriormente.

- c. Inserto.

Las secuencias insertadas en el BAC, provenientes del HCoV-SA12-EMC, por si mismas no son nocivas pero el virus rescatado a partir del BAC sí lo es, tal y como se ha expuesto anteriormente.

- d. Vector.

El BAC no presenta propiedades nocivas.

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

- a. Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

El virus recombinante puede producir enfermedad respiratoria grave, así como fallo renal y muerte en los humanos.

- b. Efectos para el medio ambiente.

Teniendo en cuenta que el virus recombinante se va a manejar en todo momento en instalaciones de nivel 3 de contención biológica no va a estar presente en el medio ambiente.

3. Descripción de las fases críticas de los ensayos en cuanto a bioseguridad):

⁵. Si se considera que no tienen efectos adversos para la salud y el medio ambiente, también hay que justificarlo.



El virus recombinante se transmite por vía aérea por lo que procesos de centrifugación o formación de aerosoles podrían suponer un riesgo de bioseguridad durante la manipulación del virus. Es por ello que 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 perceptivos 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.

4. Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse en las diferentes fases:

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. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA⁶

1. Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

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

2. Formación del personal adscrito:

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

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

3. Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

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

4. Programas de mantenimiento de los sistemas de confinamiento y protección:

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.

⁶ En el caso de que la actividad se realice en una instalación ya autorizada, se deberán describir las medidas de protección adicionales a las descritas en el formulario B que se presentó en la solicitud para la autorización de la instalación, teniendo en cuenta el riesgo específico de la actividad.



- 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 y contingencia:

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