



PARTE A Y C

DIRECCION GENERAL CALIDAD Y
EVALUACIÓN AMBIENTAL

**Actividades de
tipo 3 y 4**

COMISIÓN NACIONAL DE
BIOSEGURIDAD

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

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Responsables de la actividad

a. Entidad

Nombre: CENTRO DE BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CSIC-UAM)

Dirección postal: C/ NICOLAS CABRERA 1, 28049 MADRID

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: PAOLA BOVOLENTA NICOLAO

NIF: 33534698P

Cargo: DIRECTORA

Tel: 911964424

Correo electrónico: direccion@cbm.csic.es

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: BRUNO HERNAEZ DE LA PLAZA

NIF: 08929655C

Cargo: Investigador Doctor CSIC- Personal Laboral fijo

Tel: 911964590

Correo electrónico: bhernaez@cbm.csic.es

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

Nombre y apellidos: GEMA CAPARRÓS DE LA JARA

NIF: 05432793D

Cargo: RESPONSABLE DE BIOSEGURIDAD

Tel: 911964537

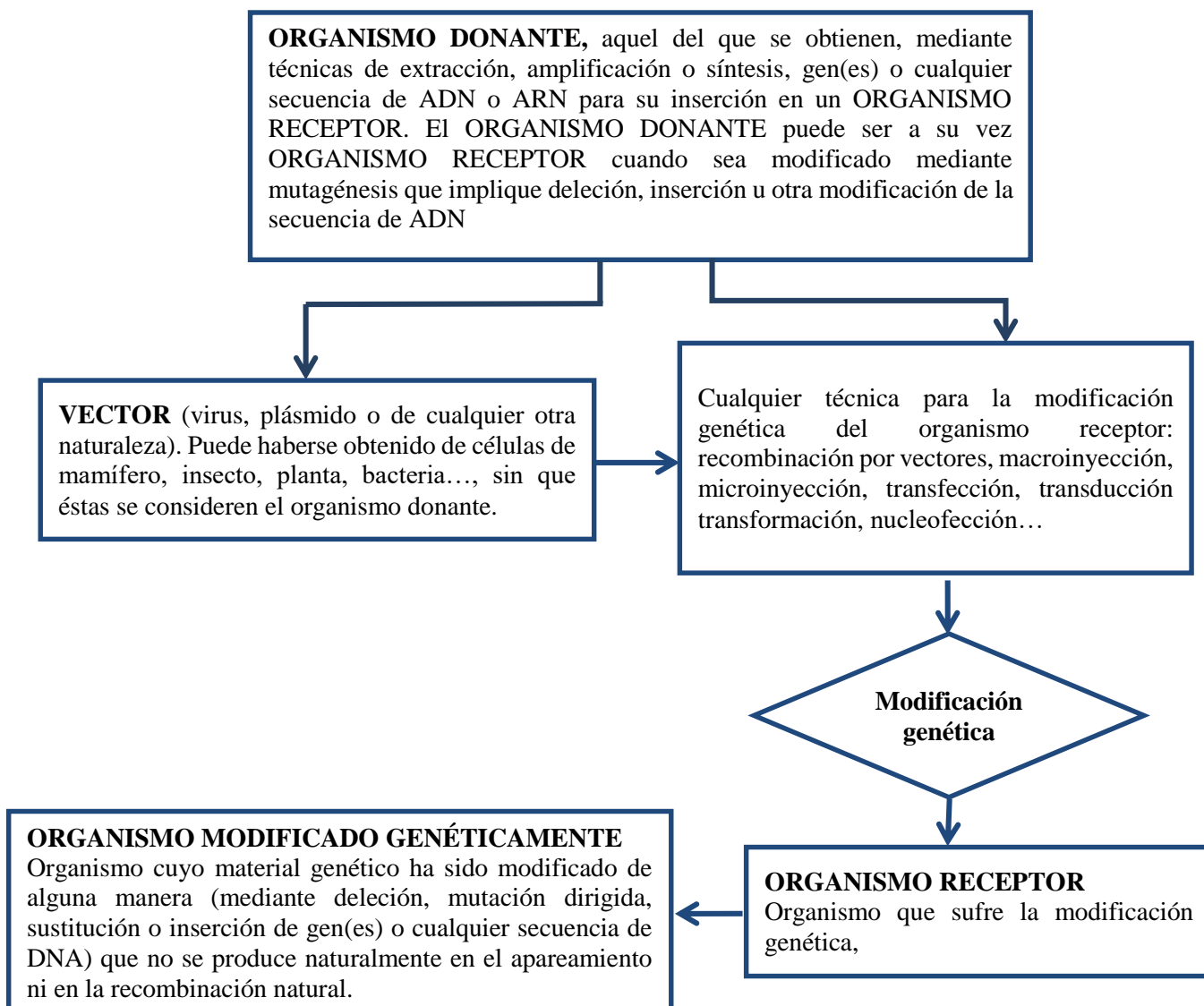
Correo electrónico: gcaparros@cbm.csic.es

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

GEMA CAPARROS DE LA JARA



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:

PROYECTOS DE GENERACION DEL CONOCIMIENTO 2022

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

PID2022-13686/NB-100, Bruno Hernáez de la Plaza

- Organismo financiador:

Agencia Estatal de Investigación- Ministerio de Ciencia e Innovación

Otro tipo de financiación²

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-..):

A/ES/17/I-22 y A/ES/17/I-23

- Fecha de autorización de la instalación:

21/07/2017 y 06/11/2017

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/./I-..)

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.

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

³Debe 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:

Se solicita autorización para i) generar 5 virus mpox (anteriormente virus de la viruela del mono), defectivos cada uno de ellos en los 5 genes virales que codifican para las 5 diferentes proteínas de unión a quimioquinas. ii) Una vez generados, estos OMGs se emplearán para infectar ratones CAST EyJ en estudios de patogénesis comparada con el fin de determinar la relevancia y contribución de estos genes virales al desarrollo de la enfermedad mpox.

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

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"/> | |

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



- Hongo
- Virus
- Protozoos

-Especificar el nombre científico y común:

Mpox virus, virus de la viruela del mono. Aislado UK-P2_2018, proporcionado por la European Virus Archive (EVAg), <https://www.european-virus-archive.com/virus/monkeypox-mpxv-uk2-2018>.

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i) Técnicas de aislamiento: Se empleará la técnica de aislamiento por plaqueo sobre monocapas de células BSC-1 en medio semisólido para aislar los clones iniciales que contengan la delección de los genes virales de interés.
- ii) Técnicas de identificación: i) Visualización directa de las partículas virales de mpox virus por microscopía electrónica tras tinción negativa con acetato de uranilo. ii) Determinación del tamaño y morfología de la placa viral característica formada en monocapas de células BSC-1. iii) Obtención de la secuencia completa por secuenciación masiva (NGS-Illumina) del genoma extraído directamente de partículas virales purificadas por ultracentrifugación en dos gradientes de sacarosa de manera sucesiva
- iii) Marcadores genéticos: Una PCR convencional usando oligonucleótidos específicos para amplificar los genes virales delecionados permitirá distinguir los virus recombinantes generados del virus parental o virus salvaje
- iv) Marcadores fenotípicos:
- v) Estabilidad genética: Secuenciación completa del genoma viral por NGS en 5 sucesivos pases de cultivo celular hasta lograr el stock viral definitivo

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

SI

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

Se ha realizado la caracterización genómica de las preparaciones de estos stocks virales, purificados a partir de cultivos celulares, empleando secuenciación masiva o NGS para determinar la totalidad de material genético (DNA y RNA), constatando que no existía otra fuente de este material que no se correspondiese con el DNA del mpox virus salvaje, que en este caso sería la cepa receptora. Además, se han realizado pruebas de detección de micoplasma con resultado negativo y se ha examinado la preparación del virus purificado al microscopio electrónico para comprobar el grado de pureza y descartar la presencia de bacterias, protozoos o restos celulares.

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):

SI

Para:

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



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

Tras un contacto directo con el virus se producen lesiones cutáneas, inicialmente en la zona de contacto, que posteriormente pueden extenderse a otras zonas del cuerpo, acompañados de dolor, fatiga, fiebre, dolor muscular e inflamación de ganglios. Normalmente, la enfermedad se desarrolla en un periodo de 2 a 4 semanas. La gravedad de la enfermedad depende del estado del sistema inmune del sujeto infectado, especialmente grave en aquellos sujetos inmunodeprimidos

NO

- 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:

Tenemos la experiencia previa de un estudio durante el reciente brote de mpox en 2022. Nuestro grupo de investigación recibió muestras clínicas de saliva procedentes de pacientes diagnosticados positivamente para esta enfermedad. En las mismas instalaciones BSL-3 del CBMSO, aislamos virus procedentes de estas muestras, aislamos y caracterizamos genéticamente un clon infeccioso de mpox virus que crecimos en cultivo celular, siempre en estas instalaciones. Además, nuestra tradicional línea de investigación incluye el estudio de la modulación de la respuesta hospedadora por otro poxvirus del mismo género que mpox virus, que es el virus ectromelia, causante de la viruela del ratón. En el CBMSO el virus ectromelia se ha de manipular también en las instalaciones BSL-3 para evitar una posible transmisión a las diferentes líneas de ratón existentes en el animalario del CBMSO. En resumen, este grupo de investigación tiene amplia experiencia en la manipulación de poxvirus en las instalaciones BSL-3 del CBMSO y además reciente experiencia en la manipulación y aislamiento de mpox virus. Respecto a la infección de ratones con poxvirus, el investigador principal posee una amplia experiencia en ensayos de patogénesis en ratones con el virus ectromelia y vaccinia, empleando diversas rutas de inoculación.

- 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



ii) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

Falta de humedad, temperatura por encima de los 50°C, o radiación UVA impactan claramente sobre la viabilidad de mpox virus

iii) Posibles nichos ecológicos:

Mpox virus replica mayoritariamente en órganos linfoides, como los ganglios o el bazo de seres humanos, simios y diversos tipos de roedores. También replica en la dermis dando origen a las pústulas o lesiones cutáneas características. Se transmite entre individuos, principalmente a través del contacto estrecho con las lesiones cutáneas de individuos infectados o la ingesta de animales infectados. También replica en las dermis, en aquellas zonas de contacto

iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

El periodo de incubación de la enfermedad es de 3-17 días, momento a partir del cual un individuo se considera infeccioso y puede contagiar a otro.

h. Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

Ninguna



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

En las zonas endémicas, el virus se transmite de manera natural entre determinados roedores africanos del tipo rata o ardilla produciendo en estos animales síntomas como letargia, pérdida de apetito, fiebre, inflamación de los ganglio o erupciones cutáneas. De manera esporádica, mpox virus es capaz de infectar desde estos roedores a monos y humanos, bien por mordeduras o por ingesta de carne infectada. También se han realizado infecciones experimentales en perritos de las praderas, en los que se ha podido reproducir gran parte de la sintomatología de mpox

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

Diversos países del Africa subsahariana. Entre ellos: Benin, Congo, Camerún, Gabon, Sierra Leona, Nigeria, Costa de Marfil, Ghana o República Centroafricana

j. Hábitat natural del organismo:

Áreas de selva tropical de África Central y Oriental

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:

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.

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):

SI Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros

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

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.):

- g.** Método de obtención:

– Extracción

– PCR

– Síntesis *in vitro*

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

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

No existe organismo donante



IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

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

Deleción de los genes virales codificantes para las 5 diferentes proteínas de unión a quimioquinas. Cada uno de los 5 OMGs generados representa la deleción de un único gen.

2. Tipo de modificación genética:

- Inserción de material genético
- Deleción 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:

Recombinación homóloga, que implica transfectar con un plásmido de transferencia células infectadas por mpoX virus. Este vector de transferencia incluye la secuencia a insertar flanqueada por las regiones de recombinación homóloga FL y FR (ver mapa)

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):

plásmido

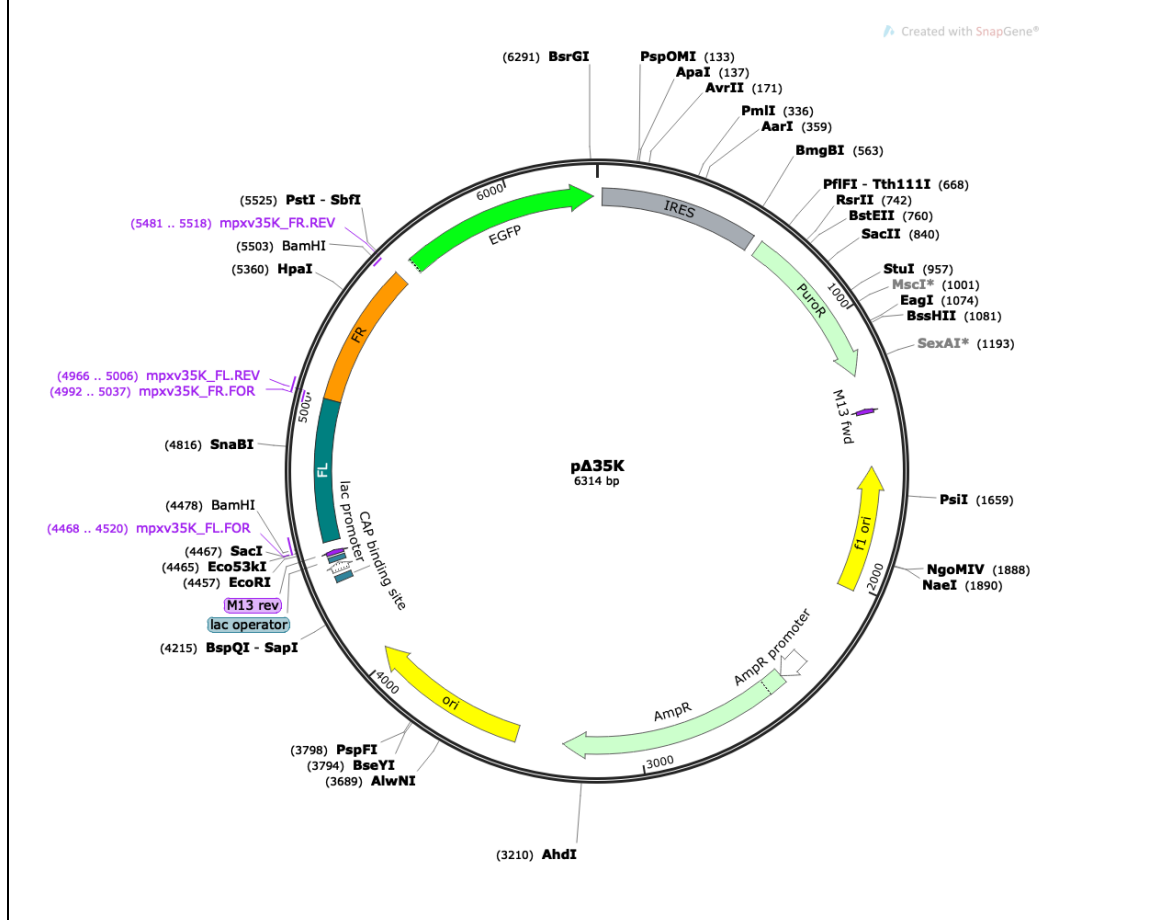
- i) Aportar mapa de restricción del vector. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación y cualquier otro elemento presente en el vector.

Para cada uno de los 5 virus a generar se emplearán un vector diferente, pero todos ellos basados en el mismo vector denominado pMS30 (*Alejo et al, 2009, DOI: [10.1371/journal.pone.0005175](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005175)*). Sobre este vector, que porta un gen de resistencia a ampicilina y el gen de la GFP, se insertan las regiones flanqueantes derecha (FR) e izquierda (FL) de los genes virales a deleccionar. Estos genes son la proteína de unión a quimioquinas



CC, también conocida como 35-kDa (Ortopoxvirus Gene 001), el fragmento SECRET del receptor viral de TNF CrmB (Ortopoxvirus Gene 002), A41L (Ortopoxvirus Gene 170), SECRET containing protein 1 o SCP-1 (Ortopoxvirus Gene 190) y SECRET containing protein 3 o SCP-3 (Ortopoxvirus Gene 192). Los correspondientes vectores se denominarán pΔ35-k, pΔCrmB, pΔA41L, pΔSCP1 y pΔSCP3.

A continuación, se muestra el mapa del vector de recombinación pΔ35k, usado para deletar el gen de la proteína de unión a quimioquinas CC. El resto de los vectores empleados serían exactamente iguales, salvo la secuencia de las regiones FR y FL, que serán las flanqueantes a los genes diana en cada caso.



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

c. Características de la movilidad del vector:



i) factores de movilización

No contiene

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?

Resistencia a ampicilina

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

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

Las secuencias delecionadas se corresponden con genes codificantes para proteínas virales de unión a quimioquinas. Se conoce la función de estos genes por estudios previos que han analizado estos genes en otros virus ortólogos de la misma familia (poxvirus), como el virus vaccinia o el virus ectromelia

b. Información sobre los genes estructurales:

No contiene

c. Información sobre los elementos reguladores:

No contiene

d. ¿Ha sido secuenciada?

Si

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:



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

- iii)** Se mantiene en forma episómica

- Número de copias:

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

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

- Localización cromosómica:

- Secuencias colindantes:

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

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

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 5 OMGs generados son mpox virus que, de manera independiente, carecerán de expresión de las 5 proteínas de unión a quimioquinas que presenta el virus mpox salvaje, debido a la delección de sus genes codificantes. Estos 5 genes a deleccionar en cada caso son el de la proteína de unión a quimioquinas CC, también conocida como 35-kDa (Ortopoxvirus Gene 001), el del fragmento SECRET del receptor viral de TNF CrmB (Ortopoxvirus Gene 002), el de la proteína de unión a quimioquinas A41L (Ortopoxvirus Gene 170), la “*SECRET containing protein 1*” o SCP-1 (Ortopoxvirus Gene 190) y la “*SECRET containing protein 3*” o SCP-3 (Ortopoxvirus Gene 192)

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:

Es esperable una menor tasa de replicación viral exclusivamente en las infecciones *in vivo*, ya que los genes a deleccionar están clasificados como genes de evasión de la respuesta del hospedador y su ausencia suele conllevar una ventaja al hospedador. Sin embargo, estos genes no son esenciales para crecer en cultivos celulares *in vitro*, por lo que en este caso no se esperan diferencias en la tasa de replicación.

- 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:

Es esperable una reducción de la patogenicidad en todos los casos comparado con el organismo receptor, que será de diferente magnitud dependiendo del gen deleccionado en cada uno de los OMGs generados. En ningún caso se espera un aumento de la virulencia. Por ejemplo, en estudios previos usando un virus emparentado muy semejante (virus ectromelia), la delección del fragmento SECRET ha resultado en una drástica reducción de la virulencia y la patogenicidad en el modelo de la viruela del ratón (*Alejo et al, 2018. Nat comms, 10.1038/s41467-018-04098-8*).

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

No

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

No

- f. Marcadores específicos del OMG:

La ausencia de cada uno de los 5 genes en los correspondientes OMGs será empleado como marcador genético en PCRs diferenciales



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

La experiencia pasada nos indica que deleciones de las mismas secuencias codificantes para las proteínas de unión a quimioquinas homólogas en el virus vaccinia o virus ectromelia, altamente emparentados con mpxv, se han mantenido intactas durante años en los cuales se ha propagado el virus en las mismas células descritas para esta utilización

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

Nula o muy baja. Estos OMGs serán manipulados exclusivamente siempre dentro de las instalaciones certificadas como BSL-3 por la autoridad competente localizadas en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Además, su manipulación no coincidirá con la de ningún otro patógeno, dado que se realiza en un cuarto aislado de este laboratorio, de uso exclusivo para mpx virus. Además, todos los restos derivados de la infección al finalizar el ensayo será neutralizado y destruido acorde a los protocolos de eliminación de desechos en este tipo de instalaciones

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

PCR convencional con oligos específicos para amplificar de manera diferencial con el virus salvaje las regiones delecionadas en cada caso.

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

No hay planificación de aislar estos OMGs de la naturaleza. En cualquier caso, se podrían usar las técnicas de aislamiento por plaqueo en cultivo celular descritas para el organismo receptor



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).

i) La generación de los OMGs implica la infección de células BSC-1 con el virus parental mpox y la transfección con el vector de recombinación específico. A las 72 horas post-infección (hpi) se recogen las células infectadas y se utilizarán como inóculo para infectar nuevas monocapas de células BSC-1 en presencia de puromicina como agente de selección. Se realizarán 3 rondas sucesivas en presencia de puromicina. Este procedimiento para generar poxvirus modificados se conoce como Selección Dominante Transitoria. Ya en ausencia de puromicina, se seleccionarán clones que expresen la proteína verde fluorescente de manera transitoria, ya que en un paso posterior de replicación el virus recombinante seleccionado expulsará de su genoma ambos marcadores, el gen de resistencia a puromicina y el gen de la GFP. El clon seleccionado se crecerá en células BSC-1 para obtener las cantidades de virus necesarias para los ensayos de infección detallados a continuación.

ii) Una vez generados los 5 OMGs (un mutante de delección para cada uno de los genes que codifican proteínas de unión a quimioquinas), éstos serán utilizados en ensayos de patogénesis comparada en ratón. Para ello, en el laboratorio BSL-3 del animalario del CBMSO, se inocularán ratones susceptibles de la estirpe CAST EiJ intranasalmente con cantidades crecientes de virus mpox salvaje y de los OMGs (10^4 - 10^6 pfu/animal). La inoculación se realizará con los animales dormidos tras inhalación de isoflurano. Los animales serán examinados a diario por personal del proyecto asistidos por personal especializado del animalario, en busca de diferencias en mortalidad, peso y síntomas de enfermedad. En otros ensayos, los animales infectados serán sacrificados a 5 para días post-infección para determinar la cantidad de virus en diferentes órganos diana como el bazo, los pulmones o el hígado. Los procedimientos relativos a la experimentación con la estirpe de ratones CAST EiJ con el virus mpox se encuentra autorizada por la Comunidad de Madrid en el PROEX 241.1, "Modelos murinos de patogénesis 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

0.1 ml con concentración de 10^5 unidades formadoras de placa/ml

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

In vitro: 0.1 y 0.5 ml con concentración de entre 10^5 – 10^9 unidades formadoras de placa
In vivo: 10 microlitros con concentraciones entre 10^4 y 10^6 serán inoculados en cada animal por vía intranasal

- b. Número aproximado de plantas por ensayo:

0

- c. Número aproximado de animales por ensayo:

30 ratones CAST EyJ

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 asociadas las actividades con los OMG).

El proyecto tiene una duración de 3 años por lo que el uso de los OMGs en las actividades descritas no excederá este tiempo

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.

Las propiedades nocivas del organismo receptor no se verán alteradas en cada uno de los OMG generados. El organismo receptor, en el ser humano produce lesiones cutáneas, inicialmente en la zona de contacto que posteriormente pueden extenderse a otras zonas del cuerpo, acompañados de dolor, fatiga, fiebre, dolor muscular e inflamación de ganglios. Normalmente, la enfermedad se desarrolla en un periodo de 2 a 4 semanas. La gravedad de la enfermedad depende del estado del sistema inmune del sujeto infectado, especialmente grave en aquellos sujetos inmunodeprimidos

b. Organismo donante.

No se utilizará organismo donante

c. Inserto.

d. Vector.

No se espera afectación ninguna. El vector no se integra de ningún modo en el organismo receptor. El proceso de generación por recombinación homóloga seguido de una selección dominante transitoria asegura que el clon infeccioso seleccionado finalmente contenga exclusivamente la secuencia de interés a insertar, mientras que el vector es eliminado.

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

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

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



Las mismas que se han descrito para el organismo receptor, el mpox virus salvaje,

b. Efectos para el medio ambiente.

Las mismas que se han descrito para el organismo receptor, el mpox virus

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

Inoculaciones *in vitro* para producir stocks virales:

- 1) Infección de cultivos celulares con el OMG: Implica la apertura del tubo que contiene el OMG, la toma del volumen de OMG necesario para infectar la placa que contiene las células, y el transporte de estas placas infectadas de vuelta al incubador.
- 2) Recogida del virus producido y su purificación mediante centrifugación a través de un colchón de sacarosa.
- 4) Deshecho de las placas infectadas y residuos generados en el proceso.

Inoculaciones *in vivo* de ratones:

- 1) Los animales se anestesian con isofluorano para entonces ser inoculados intranasalmente.
- 2) Examen diario de los animales para determinar peso y sintomatología de los animales infectados.

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

Todo el proceso se realizará en el laboratorio BSL-3 del CBMSO. En concreto para las distintas fases:

- 1) La infección de las células se realizará en una cabina de bioseguridad destinada exclusivamente a la manipulación de mpox virus, situada en un cuarto exclusivo para esa cabina, donde también se encuentra el incubador de células. Las placas, una vez infectadas, se sellarán con cinta aislante para evitar derrames o escape de material contaminado. Este sello evita el intercambio de gases con las células, por lo que se añadirá 10 mM Hepes para tamponar el medio y evitar su acidificación que podría dañar las células. Además, las placas se introducen en una caja cerrada desinfectada para evitar derrames dentro del incubador.
- 2) Para evitar derrames accidentales durante el trayecto desde la cabina hasta el microscopio, las placas con las células se transportarán en el interior de las cajas cerradas en las que se encuentran en el incubador.
- 3) Los animales se anestesian previamente para facilitar su inoculación y disminuir el riesgo de un accidente.
- 4) Todos los investigadores que vayan a manipular un ratón infectado estarán previamente vacunados de la viruela, acorde a la normativa de la Comunidad de Madrid.
- 5) Se empleará doble guante en la manipulación de materiales y animales que puedan suponer riesgo de contagio.



SERVICIOS INTEGRALES DE MADRID (SIS)

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA

1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Siguiendo las Normas de trabajo establecidas y teniendo en cuenta el nivel de contención de la Instalación, es difícil que se produjera un accidente. En el manual de Bioseguridad están contemplados los pasos a seguir en caso de incidente o accidente y serán conocidos éstos por todos los usuarios.

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Sensores de verticalidad, equipos de protección individual de un solo uso (mascarilla FFP2, guantes, monos, calzas y gorros), capuz, rotores con tapas estancas antiaerosoles, contenedores herméticos, respirador motorizado, cabinas de bioseguridad de tipo II, SAS y autoclaves,

3. Descripción de la información y formación suministrada a los trabajadores:

Los trabajadores recibirán toda la información por escrito y formación práctica por parte de los técnicos responsables del laboratorio antes de realizar la experimentación para así garantizar que el trabajo se realizará de forma segura.

4. Planes de emergencia y contingencia:

Los planes de emergencia son los incluidos en la memoria de la Instalación y son conocidos por todo el personal que vaya a entrar en la misma