



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: **IRTA-CReSA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries)**

Dirección postal: **Torre Marimon, Crt C-59 km 12,1; 08140, Caldes de Montbui**

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: **Josep Usall Rodié**

NIF: **40.893.753-Y**

Cargo: **Director General**

Tel: **934.674.040**

Correo electrónico: **josep.usall@irta.cat**

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: **Marta Sitjà**

NIF: **40.336.105-Q**

Cargo: **R&D Director - Biologicals**

Tel: **(34) 972 43 06 60**

Correo electrónico: **marta.sitja@hipra.com**

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

Nombre y apellidos: **Xavier Abad Morejón de Girón**

NIF: **35.082.196-C**

Cargo: **Jefe de la Unidad de Biocontención y Laboratorios NBS2**

Tel: **(+34) 93.467.40.40 Ext. 1712**

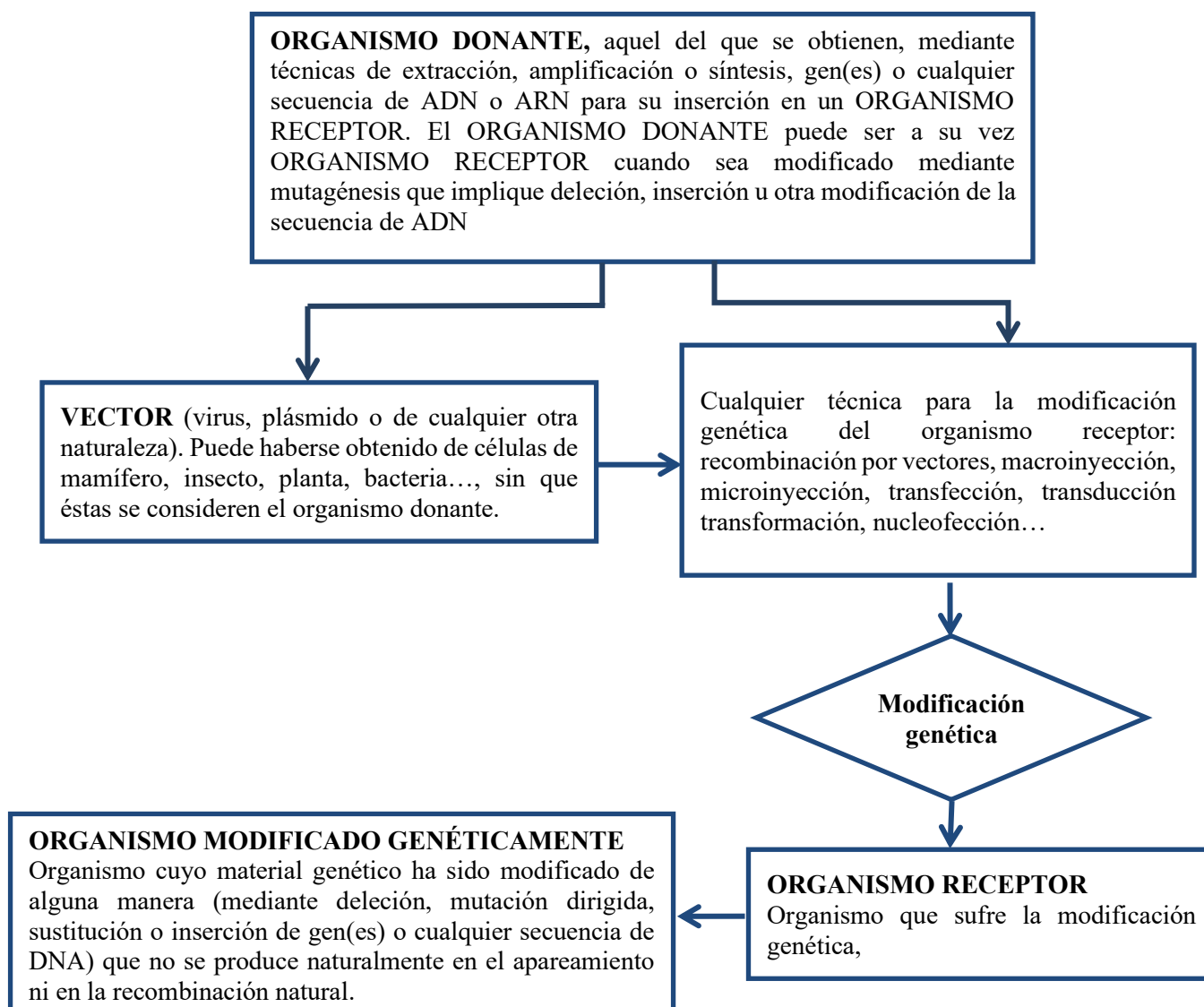
Correo electrónico: **xavier.abad@irta.cat**

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

Xavier Abad



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 en Colaboración Público-Privada 2022

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

CPP2022-009531

- Organismo financiador:

MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN, GOBIERNO DE ESPAÑA

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/16/ I-06

- Fecha de autorización de la instalación:

27 mayo 2016

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.

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:

La peste porcina africana (PPA) representa hoy día, una gran amenaza para la industria porcina. Actualmente no existe ninguna vacuna experimental segura en campo capaz de detener su propagación. Siendo el sacrificio masivo del ganado porcino la única medida establecida.

Con el objetivo de desarrollar una vacuna completamente segura frente a la PPA, se pretende generar virus recombinantes incapaces de replicar fuera de condiciones de laboratorio.

Para cumplir este objetivo; se generarán varios virus (OMG) procedentes del mismo virus parental (VPPA Arm/07/cbm/c2), carentes cada uno de una proteína concreta. Estas proteínas serán reemplazadas por recombinación homóloga por genes “reporter” sintéticos, (uno colorimétrico o uno fluorescente), para poder hacer su selección durante el proceso.

En HIPRA SCIENTIFIC se están desarrollado 11 líneas celulares provenientes de la línea celular COS-1 - ATCC (CRL-1650, Organismo: *Cercopithecus aethiops*). Estas líneas se están modificando para que expresen de forma constitutiva cada una de las proteínas seleccionadas. Al finalizar el proceso, los virus recombinantes (OMG) generados, serán defectivos en propagación fuera de las células modificadas, lo que confiere un grado adicional de seguridad a los OMGs generados.

Los experimentos se realizarán en las instalaciones de alta biocontención (nivel de bioseguridad 3) del CReSA una vez aprobados por los comités de experimentación animal (IRTA y Generalitat) y el Comité de Bioseguridad del IRTA y la Comisión Nacional de Bioseguridad.

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).

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



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"/> | |
| Hongo | <input type="checkbox"/> | |
| Virus | <input checked="" type="checkbox"/> | |
| Protozoos | <input type="checkbox"/> | |

-Especificar el nombre científico y común:

Nombre científico: ASFARVIRIDAE

Nombre común: Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA)

Aislado: **Arm/07/cbm/c2**. Este virus NO es un organismo modificado genéticamente. Se trata de una variante natural contenida dentro del stock natural del virus Armenia/07, sin modificaciones genéticas y cuya homología de secuencia con el parental Armenia/07 es 99,95%.

REFERENCIAS: doi: 10.3390/vaccines8040625

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i) Técnicas de aislamiento: aislamiento en células COS-1
- ii) Técnicas de identificación: PCR, NGS
- iii) Marcadores genéticos: diversas proteínas virales
- iv) Marcadores fenotípicos: Efecto citopático en cultivo, hemadsorción
- v) Estabilidad genética: Estable en células tras 20 pases

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

SI

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

NGS

NO

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

No aplica

c. Modificación genética anterior:



SI

– Describir:

No aplica

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

No aplica

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):

Patógeno en *sus scrofa*, tanto cerdo doméstico como jabalí europeo

SI

Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros



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

No aplica

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:

Toda experiencia adquirida proviene de una colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Yolanda Revilla del CBMSO, experta entre otros, con el VPPA y ha sido transferida al equipo de HIPRA SCIENTIFIC y el IRTA-CreSA, donde se trabaja con agentes biológicos de hasta nivel de bioseguridad 3. Además, dentro del equipo científico de HIPRA SCIENTIFIC, que desarrollará y supervisará estas actividades, se encuentra la Dr. Elisabet López que presenta una amplia experiencia trabajando con virus de bioseguridad de nivel 3, especialmente con el VPPA, tema que defendió en su tesis doctoral.

REFERENCIAS:

doi: 10.3390/v13091678.

doi: 10.3390/vaccines9010029

doi: 10.3390/vaccines9050508

doi.org/10.3390/v12121474

doi.org/10.1038/s41598-020-74651-3

doi:10.1186/s40813-020-00154-2.

doi:10.3390/vaccines8020262.

doi: 10.1128/JVI.01058-17 .

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 El virus de la PPA no puede expandirse sólo, ya que necesita la presencia de células eucarióticas susceptibles (garrapatas, células de cultivo, cerdos o jabalíes vivos). Aun así, se espera que el organismo receptor pueda sobrevivir fuera del huésped, pero al ser un virus con envuelta se puede desinfectar/inactivar con distintos métodos y su periodo de supervivencia fuera del huésped es limitado.

- 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:

El VPPA es resistente a bajas temperaturas, pero se ha visto que el virus se inactiva a 56°C durante 70 min o 60°C durante 20 minutos. El virus en aerosoles no es viable cuando la humedad relativa está por encima del 50%. También se ha observado inactivación del virus a pH 11.5. Muy estable en secreciones de animales infectados, tejidos, sangre y heces, así como en carnes frescas y productos derivados del cerdo.

REFERENCIAS:

https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manualpracticoppa_tcm30-428107.pdf

iii) Posibles nichos ecológicos:

Cerdos, jabalíes, garrapatas del género *Ornithodoros* y cerdos salvajes africanos (facóqueros).

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):

No presenta ninguna implicación en procesos ambientales.



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

No aplica

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

Erradicado en España. Actualmente circula por algunos países de la UE y del continente asiático el genotipo II y es endémico en algunos países del África subsahariana donde circulan los 24 genotipos existentes.

j. Hábitat natural del organismo:

Macrógafos de Cerdos, jabalíes y cerdos salvajes africanos (facóqueros). También replica en Garrapatas del género *Ornithodoros* .

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 checked="" type="checkbox"/> |
| Planta | <input type="checkbox"/> |
| Bacteria | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Hongo | <input type="checkbox"/> |
| Virus | <input type="checkbox"/> |
| Protozoos | <input type="checkbox"/> |

-Especificar el nombre científico y común:

Se usarán dos tipos de vectores plasmídicos por cada proteína:

- Plásmidos sintéticos portadores de la secuencia de ADN de la proteína fluorescente (eGFP) que recombina en el lugar de la proteína de interés.

Nombre científico: *Aequorea victoria*. ; Nombre común: medusa de cristal

- Plásmidos sintéticos portadores de la secuencia de ADN de la enzima β -glucuronidasa (GusA) que recombina en el lugar de la proteína de interés.

Nombre científico: *Escherichia coli*. ; Nombre común: *E.coli*

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.

Los vectores son plásmidos sintéticos sin elementos de origen animal

NO

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



No aplica

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):

No

SI Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros

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

No aplica

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 del gen “reporter”: eGFP o GusA

g. Método de obtención:

– Extracción

– PCR

– Síntesis *in vitro*

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

-eGFP (del inglés *green fluorescent protein* o proteína verde fluorescente) es una proteína que emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible.

-GusA(β -glucuronidasa) es una enzima que interviene en el metabolismo de los hidratos de carbono en *E.coli*



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



IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

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

Deleción de proteínas por inserción de genes *reporter*, con la finalidad de sustituirlos.

La finalidad última de esta modificación sería obtener, a partir del organismo receptor, que es una cepa natural virulenta que está actualmente circulando, un virus defectivo que pudiera funcionar como una vacuna frente al VPPA. Con ello pretendemos impactar en el campo científico del VPPA, ya que sería la primera vacuna experimental de VPPA totalmente segura, sin capacidad de propagarse en el ambiente debido a la naturaleza defectiva del virus generado.

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

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):

Plásmidos sintéticos, la secuencia corresponde con la del pUC57

- 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 generar los OMG, se han sintetizado 22 plásmidos. Cada vector plasmídico contiene secuencias de 1 kb, homólogas a las secuencias del virus que flanquean la proteína de interés que se quiere eliminar (llamados *Right Arm* y *Left Arm*), y que sirven para poder



recombinar con el organismo receptor (VPPA). Dentro de estas regiones encontramos el gen sintético *reporter* que se intercambiará con la proteína vírica para generar los distintos OMG. Detalles de vectores y secuencias se pueden encontrar en ANEXO I (confidencial).

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.

No aplica

b. Gama de hospedadores del vector:

Escherichia coli

c. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No aplica.

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.

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

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

eGFP-LoxP: La eGFP actúa como gen *reporter* fluorescente en los OMG, bajo el control del promotor viral. La incorporación del gen eGFP es necesaria para hacer un seguimiento diario y selección por *Cell-sorter* (Fluorescencia) de los clones virales que contienen la deleción deseada y el gen de la eGFP en su lugar. Este gen se encuentra bajo el control del promotor viral. Flanqueado por secuencias LoxP por si se plantea su deleción en un futuro.

GusA-LoxP GusA en los OMG actúa como gen *reporter* colorimétrico. La incorporación del gen GusA es necesaria para poder seleccionar los clones virales que contienen la deleción deseada y el gen gusA en su lugar. Añadiendo el sustrato para la proteína para la que codifica el gen gusA usamos 5-brom-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-gluc) se visualizan los clones de color azul para facilitar el aislamiento de los virus recombinantes mediante plaqueo. Este gen se encuentra bajo el control del promotor viral. Flanqueado por secuencias LoxP por si se plantea su deleción en un futuro.

b. Información sobre los genes estructurales:

No aplica.

c. Información sobre los elementos reguladores:



Promotor vírico que controla la expresión de los genes *reporter* eGFP o GusA y secuencias loxP para eliminar, si se desea, el gen “reporter”

d. ¿Ha sido secuenciada?

Si, por NGS.

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:

El gen *reporter* que codifica para la eGFP o GusA se inserta en lugar de la proteína específica a delecionar

o Secuencias colindantes:

Contiene secuencias colindantes LoxP por si se quiere delecionar el gen *reporter* en un futuro. También contiene 1 kilobase *upstream* y 1 kilobase *downstream* del genoma del virus VPPA gen de interés a delecionar.

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

No

iii) Se mantiene en forma episómica

- Número de copias:

No aplica

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

No aplica

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

Generación de virus defectivos cada uno en una proteína específica. En su lugar lleva insertado el gen que codifica la proteína verde fluorescente (eGFP) o el gen GusA (β -glucuronidasa)

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:

Si. Los virus carecen de diferentes proteínas desarrollando su ciclo vital solo en aquellas células modificadas para ello genéticamente y que expresen dicha proteína y se la otorgue de forma exógena. Estas células que no se encuentran de forma natural, solamente en un laboratorio, de manera que la supervivencia fuera de este cultivo específico es nula.

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

Los virus solo pueden completar su ciclo en células modificadas que expresen la proteína de la que carecen. El ciclo vírico se ve completamente interrumpido sin la aportación exógena de estas proteínas.

- 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:

Si. Se trata de un virus que no puede sobrevivir ni en el huésped habitual, ni en cultivo general, se trata de un virus defectivo que solo crece en una línea celular característica, no presente en la naturaleza.

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

Este virus no puede afectar al medio ambiente ya que carece de capacidad de replicación en la naturaleza.

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

No aplica

- f. Marcadores específicos del OMG:

Gen *reporter* eGFP o gusA

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

Las deleciones genéticas son estables por naturaleza, ya que el gen se elimina del genoma y no puede volver a aparecer de forma espontánea. Una vez obtenido el OMG se realizarán estudios de estabilidad a corto y largo plazo.

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



No

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Citometría de flujo-Separador celular, PCR, secuenciación, placas de lisis

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

No aplica.



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).

Generación de virus defectivo sobre células COS-1 modificadas genéticamente. Ensayos in vitro de crecimiento e infección sobre células COS-1 *wild-type* y modificadas, secuenciación.

Todas estas actividades se llevarán a cabo siempre dentro de las instalaciones de alta bioseguridad del IRTA-CReSA, siguiendo la normativa establecida

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

Las operaciones de infectar células, producir virus recombinantes, titular dichos virus, purificar DNA de para NGS, producir muestras desnaturalizadas para ser procesadas en distintas tecnologías de análisis de proteínas virales por Western-blot o qPCR, incluyen como máximo una escala del orden de mililitros

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

No aplica

- 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).

El proyecto empezará en Enero de 2024 y se prevé que finalice en Diciembre 2025.

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 VPPA afecta a cerdos domésticos y jabalíes, causando una patogenicidad caracterizada por una hemorragia interna generalizada que puede provocar mortalidades del 100% en cepas virulentas.

- b. Organismo donante.

No aplica ya que es un gen sintético. Aunque la secuencia original proviene de MEDUSA Y BACTERIA

- c. Inserto.

Un gen sintético que contiene una proteína fluorescente o una proteína colorimétrica sin ningún tipo de efecto nocivo.

- d. Vector.

Los vectores plasmídicos son de carácter sintético y solamente se usarán para la recombinación homologa para generar los OMGs. No se esperan interacciones con otros organismos en el medio ambiente ni tampoco ningún efecto en ningún otro organismo. El vector replica en *Escherichia coli*, como la mayoría de vectores comerciales disponibles sin efectos nocivos.

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

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

No tiene efectos nocivos en la salud humana. No se esperan interacciones con otros organismos en el medio ambiente ni tampoco ningún efecto en ningún otro organismo. En su huésped habitual no puede propagar.

- b. Efectos para el medio ambiente.

No se esperan interacciones con otros organismos en el medio ambiente ni tampoco ningún efecto en ningún otro organismo. En su huésped habitual no puede propagar.

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

Las fases críticas son todas aquellas en las que se manipula el OMG y se replica en las instalaciones de bioseguridad de nivel 3 con muestras que contienen el virus en cultivos celulares. No se prevé ningún riesgo ya que se siguen los protocolos de nivel de bioseguridad 3 del IRTA-CReSA

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

Todas las actividades realizadas para la generación de los OMG se harán en las instalaciones de alta bioseguridad del IRTA-CReSA. El confinamiento será el típico de una unidad de Alta Biocontención de grandes animales (con duchas obligatorias de salida, filtración absoluta del aire, descontaminación química de los efluentes y eliminación de las carcasas infectadas por digestión alcalina o incineración). Todas estas barreras de confinamiento y control garantizan su no diseminación al exterior, por tanto, nulo impacto ambiental. Todos los residuos generados serán

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



objeto de recogida por gestores autorizados. En los que respecta a la exposición humana, el patógeno animal es exclusivo de la especie porcina y no supone ningún riesgo para la especie humana, pero el personal en los boxes experimentales trabajará con guantes y mascarilla quirúrgica y en laboratorio todas las muestras se procesaran con los EPIs habituales y dentro de cabina de seguridad biológica.

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

1. Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

El Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) está certificado en Buenas Prácticas de Laboratorio por la Generalitat de Catalunya (Departament de Salut) desde el año 2009, con diversas renovaciones. El certificado actual tiene la referencia BPLI/2311/001/CAT (20 de octubre de 2023).

2. Formación del personal adscrito:

El personal experimental adscrito tiene experiencia probada desde hace muchos años en el manejo de infecciones experimentales con el virus de la peste porcina africana, salvaje y atenuado. El personal al cargo de las instalaciones y el cuidado de los animales tiene experiencia equivalente. El personal tiene a disposición formaciones internas semestrales de bioseguridad, biocontención, uso de equipos críticos y equipos de protección individual. La mayoría de ellos son doctores en veterinaria o biología y el personal al cuidado de los animales dispone de la preceptiva autorización.

3. Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Aplicación de una desinfección de bancadas, superficies de trabajo e interior de cabinas de seguridad biológica, con diluciones 1/10 de lejía doméstica fresco, preparado en el día, con una concentración de cloro libre de 4.000-5.000 ppm, por tiempo de contacto 5-10 minutos y posterior retirada por aplicación de nebulización de una solución de etanol al 70%. Otros desinfectantes sustitutivos de la lejía diluida 1/10 son el Virkon al 1% o el PERAsafe a las concentraciones indicadas por el fabricante. En cuanto a animalario consultar procedimientos internos específicos, aunque el desinfectante de rutina es Virkon a concentraciones entre el 1% y el 4%.

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

Para CReSA-NBS3: Programa de mantenimiento de aparatos por el confinamiento, entendiendo como elementos de confinamiento; cabinas de seguridad biológica; centrifugas; autoclaves barrera y SAS (Airlock) MATACHANA, sistemas de generación de presión negativa, etc. Durante la parada técnica anual, los equipos son sometidos a verificación, y mantenimientos programados por parte de servicios técnicos externos (SAT), en ocasiones el mismo fabricante, con la emisión de los correspondientes informes de cumplimiento de especificaciones / rango de trabajo.

5. Programas de verificación y validación de los sistemas de confinamiento y protección:

Para NBS3: Parada técnica anual de la Unidad de Alta Biocontención en la que se hace un control y revisión de los principales elementos críticos de la instalación. Control del confinamiento 24/365 por un sistema electrónico de gestión de parámetros críticos y un servicio del mantenimiento

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.



subcontratado externo siempre presente en la instalación. Auditorías internas a cargo del personal de la Oficina de Garantía de Calidad de CReSA.

IX. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1. Encargado de la gestión de residuos:

a. Gestión interna: SÍ NO

– Método de inactivación, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados:

Para CReSA-NBS3:

Para residuos sólidos, Autoclave con una fase de esterilización que llega a 121°C y mantiene esta temperatura durante 25 minutos (alternativamente tratamiento a 134°C por 5 minutos). Para residuos líquidos, Autoclave con una fase de esterilización que llega a 121°C y mantiene esta temperatura durante 25 minutos, sin fase de secado posterior.

Las autoclaves disponibles son: los propios Laboratorios NBS3 equipo MATACHANA S1000 n/s E-18015 y CR-0576; sala limpieza zona sucia, equipo MATACHANA n/s E-18016 y CR-0476 y en sala efluentes planta 0, equipo MATACHANA n/s E-18017 y CR-0477.

La eficacia de las autoclaves se evalúa con cada carga infecciosa con testigos microbiológicos de *Geobacillus stearothermophilus*, y anualmente por sondas propias calibradas (verificación interna) y verificación / mapeo por empresa externa.

Digestión alcalina de los cadáveres de animales infectados con patógenos no zoonóticos, mezclando carcasas y una solución de hidróxido potásico, hasta alcanzar un pH 13 y una temperatura de 150°C por un mínimo de 3 horas a 3 atmósferas de sobrepresión. Para cadáver infectados con virus zoonóticos, no es el presente caso, incineración en contenedores cerrados y herméticos para evitar toda manipulación por parte del personal ejecutante.

Tratamiento químico de los efluentes: Elevación del pH a 12 mediante la adición de hidróxido sódico (NaOH), con comprobación manual del valor de pH una vez alcanzado, mantenimiento en agitación constante durante 12 horas, neutralización del pH por adición de ácido clorhídrico (HCl) hasta alcanzar un pH entre 8 y 9,4. Una vez comprobado este pH hay que solicitar obligatoriamente autorización al responsable de la Unidad de Alta Biocontención o persona delegada, para proceder al vaciado del tanque.

Doble filtración mediante filtros HEPA de todo el aire que hay en la Unidad de Alta Biocontención (NBS3). Filtro HEPA absoluto a la salida de cada box experimental donde se mantienen los animales o bien en la sala de necropsias y batería de filtración de 10 filtros HEPA absolutos previamente a la salida hacia el exterior lo que supone una doble filtración absoluta de todo aire que se encuentra dentro de la Unidad de Alta Biocontención.

En cuanto a los residuos citostáticos (agentes mutagénicos, intercalantes, caotrópicos, etc.) como pueden ser soluciones con bromuro de etidio, tampones de lisis y lavado de kits de extracción de ácidos nucleicos, etc., estos se descartan en bidones por residuos de tipo IV que son cerrados herméticamente y recogidos por gestor de transporte de residuos autorizado.

b. Gestión por una empresa externa: SÍ NO

– Nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:

PREZERO



X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA

1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Inoculación accidental por mala praxis o uso de EPIs inadecuados; corte o pinchazo con objeto cortado o punzante por mala praxis o no uso de los EPIs correspondientes; inhalación y / o contacto con mucosas de producto químico tóxico, corrosivo, etc. por mala praxis o no uso de los EPIs correspondientes.

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Para CReSA-NBS3: El trabajo en la Unidad de Alta Biocontención implica trabajar con indumentaria específica de la instalación, no se trabaja con ropa de calle u objetos personales. Técnica de doble guante a todas las actividades con muestras dentro y fuera de CSB. Bata de laboratorio parcialmente hidrofuga de frontal sólido, de puño cerrado. Calzado desinfectable. Disponibilidad de protección respiratoria (mascarillas FFP3 y aparatos de respiración de presión positiva (Sundstrom) en caso de que la evaluación de riesgo lo demande.

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

Procedimientos normalizados de trabajo de aparatos (CSB, centrifugas, autoclaves, etc.) y salas; normas de actuación en caso de derrames en cabinas de seguridad biológica, superficies y accidentes en centrifugas.

4. Planes de emergencia y contingencia:

Hay un plan de emergencia aprobado a disposición del personal.