NOTIFICACIÓN SOBRE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad
Nombre: Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA); Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC)
Dirección postal: Carretera de Algete a El Casar de Talamanca s/n; Valdeolmos - Alapardo; 28130 Madrid

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Esther Esteban Rodrigo
NIF: 05271582M
Cargo: Directora del INIA
Tel: 913473900
Fax:
Correo electrónico: esther.esteban@inia.csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Alejandro Brun Torres
NIF: c
Cargo: Investigador Científico
Tel: 916202300
Fax: 916202247
Correo electrónico: brun@inia.csic.es

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

Nombre y apellidos: Laura Pérez Palancar
NIF: 53043241C
Cargo: Jefe de Área de Animalario y Seguridad Biológica
Tel: 916202300
Fax: 916202247
Correo electrónico: laura.perez@inia.csic.es

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

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

SI ☒ NO ☐

Si la respuesta a la pregunta anterior es **SI**, debe justificarlo especificando[1]**:**

-Nombre de la convocatoria: Proyectos de generación de conocimiento 2021.

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: PID2021-122567OB-I00. Alejandro Brun/Belén Borrego

-Organismo financiador: Agencia Estatal de Investigación

3) Instalación donde se va a desarrollar la actividad de utilización confinada *(cumplimente si previamente ha sido comunicada/autorizada para este tipo de actividades; en caso contrario, cumplimente el Formulario Parte B).*

a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación: Existe autorización de uso de Instalación tipo 3. La instalación de tipo 3 del CISA-INIA (notificación A/ES/00/I-01), en la que se va a llevar a cabo la actividad, ya ha sido autorizada con anterioridad por el Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente (CIOMG) mediante resolución con fecha 04/12/2001.

b) Número de referencia del expediente: notificación A/ES/00/I-01

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

La generación de una variante vírica (denominada 40Fp8) obtenida por pases seriados del aislado parental sudafricano 56/74 del virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV) en presencia de la droga mutagénica favipiravir permitió identificar mutaciones implicadas en una profunda atenuación del virus. Estas mutaciones se localizaron en los tres segmentos de RNA del virus (Borrego B, Brun A. *A Hyper-Attenuated Variant of Rift Valley Fever Virus Generated by a Mutagenic Drug (Favipiravir) Unveils Potential Virulence Markers.* Front Microbiol. 2020;11:621463. doi: 10.3389/fmicb.2020.621463). El efecto de algunas de esas mutaciones fue analizado mediante su inclusión en un clon infectivo previamente desarrollado (Habjan M, Penski N, Spiegel M, Weber F. *T7 RNA polymerase-dependent and -independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus.* J Gen Virol. 2008;89(Pt 9):2157-66. doi: 89/9/2157 [pii]

[1]**TASAS**
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.

Clasificación de la actividad:

(Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y el anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las Notas de orientación para la evaluación del riesgo).

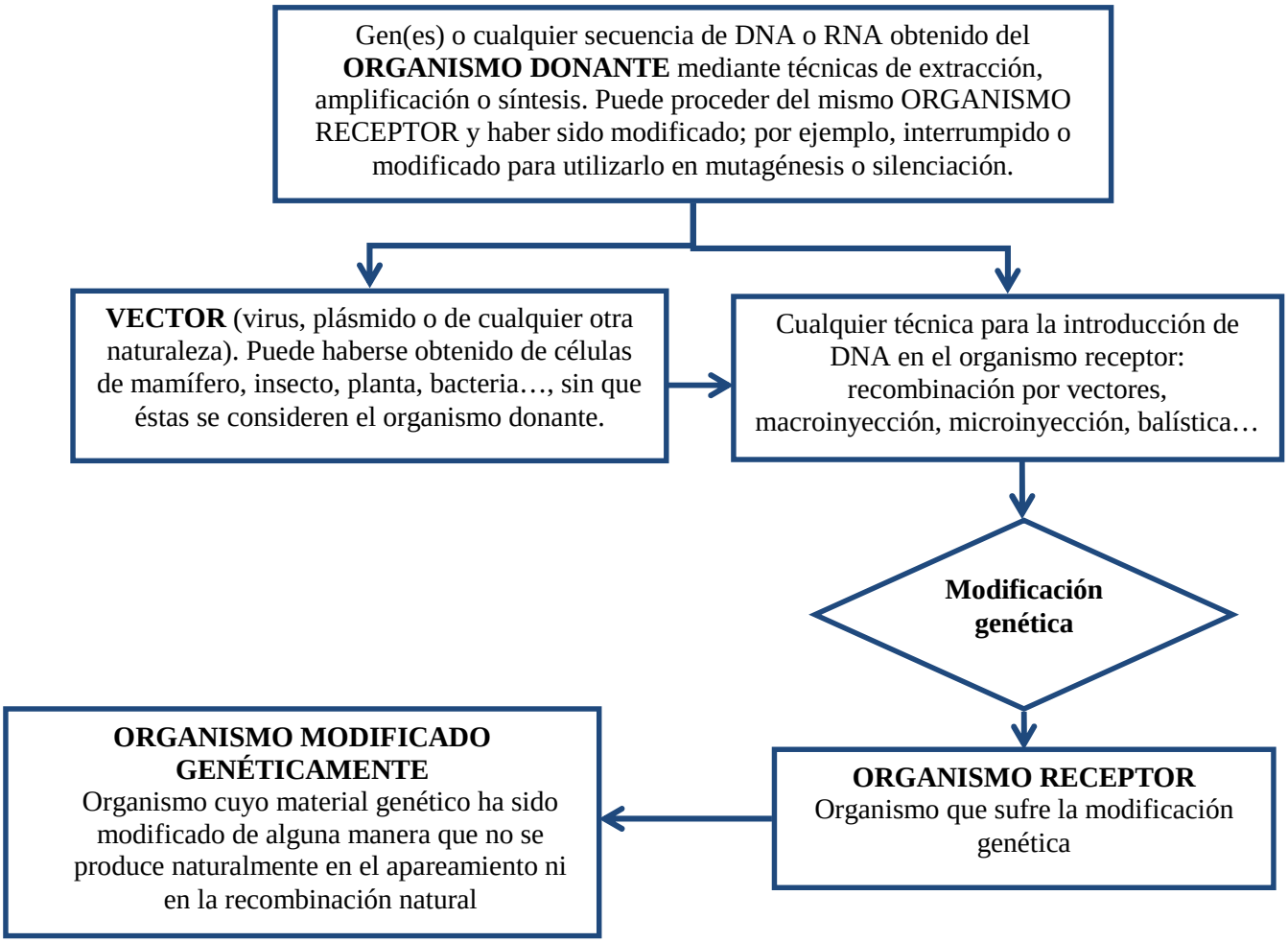
Tipo 1 ☐

Tipo 2 ☐

Tipo 3 ☒

Tipo 4 ☐

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



III. INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO RECEPTOR DEL CUAL SE DERIVA EL OMG

1) Nombre científico: RVFV-56/74

   Taxonomía: *O. Bunyavirales, F. Phenuiviridae, G. Phlebovirus*

   Nombre común: virus de la fiebre del Valle del Rift

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

   a) Técnicas de aislamiento: rescate mediante clon infectivo en cultivos de líneas celulares estables (BHK21, HEK293 y VERO)

   b) Técnicas de identificación: secuenciación, RT-PCR, Western blot, ELISA

   c) Marcadores genéticos:

   d) Marcadores fenotípicos:

   e) Estabilidad genética: El virus 56/74 se puede mantener genéticamente estable en cultivos celulares seriados alternos de células de mamífero y de insecto para evitar las deleciones que se observan si se propaga uícamante en células de mamífero, tal y como se ha descrito por Moutailler S, et al (*Host alternation is necessary to maintain the genome stability of Rift Valley fever virus.* PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(5):e1156).

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores: El virus 56/74 se rescata in vitro a partir de un clon infectivo de cDNAs con una secuencia determinada, depositada en GenBank (OM744400/01/02).

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

   SI ☒ NO ☐

5) En caso afirmativo, especificar para qué clase de los organismos *(seres humanos, animales, plantas)* se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos extracelulares: El virus 56/74 vivo se considera patógeno en los rumiantes domésticos y en el ser humano.

6) Si el organismo receptor es patógeno para los seres humanos, especificar el grupo de riesgo asignado de acuerdo con la legislación comunitaria existente, *(en particular la Directiva 2000/54/CE)* o según otros sistemas de clasificación, nacionales o internacionales *(OMS, NIH, etc.)*: Grupo de riesgo 3

   a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad? En el hombre: fiebre, dolor muscular, fatiga, náuseas, vómitos, ictericia, elevación niveles enzimas hepáticas. En algunos casos problemas oculares (retinitis), meningitis y shock hemorrágico. En animales:

fiebre limitada, abortos en rumiantes gestantes, incluidos camélidos. En animales neonatos sobreviene muerte en 1-2 días.

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

SI ☐ NO ☒

Porqué: El genoma del virus es un ssRNA(-) trisegmentado. Teóricamente sería posible un intercambio entre segmentos genómicos de dos virus relacionados pero no hay evidencia de que este tipo de reordenamientos haya ocurrido entre un virus atenuado y uno silvestre en la naturaleza, dentro del grupo de los phlebovirus o, incluso, durante el uso en campo de vacunas RVF vivas atenuadas. De ocurrir, lo más probable es que no tuviera consecuencias no deseadas tal y como ha sido discutido por Monath T.P et al., (*Theoretical risk of genetic reassortment should not impede development of live, attenuated Rift Valley fever (RVF) vaccines commentary on the draft WHO RVF Target Product Profile.* Vaccine X. 2020;5:100060. Epub 2020/04/28.

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

Si, al ser un virus rescatado a partir de cDNA clonado y expandido en cultivos libres de bacterias y de micoplasmas.

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

Nuestra experiencia se inicia en el año 2006, cuando se importaron por primera vez en España cepas del virus de la FVR procedentes de Sudáfrica. Desde entonces llevamos aplicando protocolos específicos para la manipulación del virus en confinamiento BSL-3 y 3+, así como medidas específicas de desinfección de cabinas, laboratorios e instalaciones de animalario. En concreto nuestra experiencia con el aislado receptor 56/74 es muy amplia, al haber llevado a cabo diversos experimentos de infección empleando modelos animales de laboratorio y ovinos, siempre en el entorno de bioseguridad BSL-3. Como resultado nuestro grupo ha publicado numerosos estudios científicos con este aislado vírico de referencia.

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

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

Posible para el virus 56/74.

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

i) esporas ☐

ii) endosporas ☐

iii) quistes ☐

iv) esclerocios ☐

v) esporas asexuales (hongos) ☐

vi) esporas sexuales (hongos) ☐

vii) otros, especifíquese: para el virus 56/74, por homología con lo descrito para RVFV sería posible suponer su capacidad de persistencia en los huevos de mosquitos de especies susceptibles infectados en diapausa.

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

Temperatura, radiación UV-C, humedad relativa, exposición a agentes químicos.

d) Posibles nichos ecológicos: En zonas endémicas: mosquitos, pequeños roedores, quirópteros o ungulados de vida silvestre (no domésticos).

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: Para los aislados naturales, dependiendo de las condiciones ecológicas y de hábitat se han determinado diferentes tiempos de generación de brotes epizoóticos de la enfermedad. Zonas húmedas tropicales: circulación permanente críptica, humedales y zonas de vegetación arbustiva (incluyendo sabana africana y pastizales): brotes cada 5-10 años; zonas áridas y desérticas: brotes cada 15-30 años.

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

a) Implicaciones en procesos ambientales *(p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo)*: No aplica o se desconoce

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos: Para 56/74 infecciones en animales domésticos y ser humano causando posible patología.

11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor: El aislado 56/74 procede de una vaca durante el brote epizoótico de la enfermedad en Sudáfrica en 1974, descrito por Barnard BJ en *Rift Valley fever vaccine--antibody and immune response in cattle to a live and an inactivated vaccine*. J S Afr Vet Assoc. 1979;50(3):155-7.)

12) Hábitat natural del organismo: Probablemente el virus 56/74 podría circular transováricamante en especies de mosquitos de bosque tropical africano con desbordamiento ocasional a otras especies.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: variante atenuada RVFV-40Fp8

Taxonomía: *O. Bunyavirales, F. Phenuiviridae, G. Phlebovirus*

Nombre común: RVFV- 40Fp8

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: cDNA segmentos L, M y S

3) Método de obtención:

   a) Extracción ☐

   b) PCR ☐

   c) Síntesis *in Vitro* ☒

4) Función del gen/genes en el organismo donante: El segmento L codifica la RNA polimerasa RNA dependiente del virus. El segmento M codifica una proteína no estructural (NSm) y las glicoproteínas Gn y Gc de membrana responsables de la entrada del virus en la célula huésped. El segmento S codifica la nucleoproteína N del virus y la proteína no estructural NSs.

5) ¿Es patógeno o nocivo de cualquier otra forma *(incluidos sus productos extracelulares)* el organismo donante, vivo o muerto?

   SI ☐ NO ☒

   a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

      i) seres humanos ☐

      ii) animales ☐

      iii) plantas ☐

   b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

   c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo? No, al contener mutaciones atenuadoras en los tres segmentos.

6) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural? No

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

   a) Inserción de material genético ☐

   b) Deleción de material genético ☐

   c) Sustitución de bases ☐

   d) Fusión celular ☐

e) Otros, especifíquese: intercambio de segmentos genómicos

2) Finalidad de la modificación genética:

Comprobar el nivel de atenuación inducido en el virus 56/74 (receptor) tras la inserción de segmentos completos de la variante atenuada 40Fp8. Identificar qué intercambios producen un mayor nivel de atenuación.

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

El genoma de RVFV 56/74 y de la variante 40Fp8 serán sintetizados *de novo* por una compañía biotecnológica (eg. Biomatik o GenScript), y cDNA de cada gen/segmento viral (L, M y S) serán clonados en un plásmido tipo pBluescript pBS SK(+) y flanqueados por el promotor de la RNA polimerasa T7 en el extremo 5´y por la ribozima del virus de la hepatitis delta y el terminador de la polimerasa T7 en el extremo 3´. En resumen, para cada secuencia de virus se generarán 3 plásmidos que contendrán las secuencias específicas de cada segmento de RNA vírico L, M, S.

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

SÍ ☒ NO ☐

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector: Plásmido pBSK(+)

b) Si se trata de un virus:

Es defectivo en replicación SÍ ☐ NO ☐

c) Aportar mapa de restricción del vector *(funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes en el vector):*

d) Gama de hospedadores del vector: Bacterias *E.coli* competentes tipo JM109

e) Características de la movilidad del vector: No aplica

i) factores de movilización

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

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

Todos los plásmidos son amplificados en bacteria, por tanto contienen un origen de replicación y el gen de resistencia a Ampicilina. Ninguno de estos genes (u otras secuencias de bacterias) son transferidos al organismo receptor (RVFV), y solo se utilizan para la propagación del plásmido en cultivos de bacterias.

4) Información del inserto:

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

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

Inserto L:

- Nucleótidos 1-18 y 6295-6404: secuencias no codificantes 5' y 3' (NCRs)
- Nucleótidos 19-6294: gen RNA polimerasa RNA dependiente (RdRp)

Inserto M:

- Nucleótidos 1-20 y 3612-388: secuencias no codificantes 5' y 3' (NCRs)
- Nucleótidos 21-3611: poliproteína M (Nsm/Gn/Gc)
- Nucleótidos 21-410: gen no estructural NSm
- Nucleótidos 411-2042: gen glicoproteína Gn;
- Nucleótidos 2043-3611: gen glicoproteína Gc

Inserto S:

- Nucleótidos 1-34 y 1652-1689: secuencias no codificantes 5' y 3' (NCRs)
- Nucleótidos 35-831 gen no estructural NSs
- Nucleótidos 914-1651: gen nucleoproteína N

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Cada plásmido individual (pBS SK(+)segL ó pBS SK(+)segM ó pBS SK(+)segS) se transfectan en células BSR/T7, junto con 2 plásmidos que codifican el genoma del segmento M y S ó L y S ó M y L del RVFV de la cepa 56/74 respectivamente de modo que se generan estas combinaciones:

pBS SK(+)$segL_{40Fp8}$ + pBS SK(+)$segM_{56/74}$ + pBS SK(+)$segS_{56/74}$

pBS SK(+)$segL_{56/74}$ + pBS SK(+)$segM_{40Fp8}$+ pBS SK(+)$segS_{56/74}$

pBS SK(+)$segL_{56/74}$ + pBS SK(+)$segM_{56/74}$ + pBS SK(+)$segS_{40Fp8}$

pBS SK(+)segL$_{40Fp8}$ + pBS SK(+)segM$_{40Fp8}$+ pBS SK(+)segS$_{56/74}$

pBS SK(+)segL$_{56/74}$ + pBS SK(+)segM$_{40Fp8}$+ pBS SK(+)segS$_{40Fp8}$

pBS SK(+)segL$_{40Fp8}$+ pBS SK(+)segM$_{56/74}$ + pBS SK(+)segS$_{40Fp8}$

Los virus viables serán recuperados del sobrenadante celular y amplificados en células susceptibles a RVFV, para generar un stock de trabajo.

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

El segmento L codifica la RNA polimerasa RNA dependiente del virus. El segmento M codifica una proteína no estructural (NSm) y las glicoproteínas Gn y Gc de membrana responsables de la entrada del virus en la célula huésped. El segmento S codifica la nucleoproteína N del virus y la proteína no estructural NSs. Cada segmento contiene las siguientes mutaciones con respecto a la cepa 56/74 (ver Tabla 1:

Tabla I. Cambios genéticos y fenotípicos de la variante 40Fp8 con respecto al virus parental 56/74 *(Borrego y Brun Frontiers in Microbiology 2021)*

RNA Segment	Protein/region[a]	Nucleotide position changed[b]	Nucleotide (codon) changed 56/74→40Fp8	Amino acid position[b]	Amino acid substitution[c]
L	5′end N-term	198	GGC→GGT	60	(Gly)
		317	ATG→ACG	100	Met → Thr
		396	TTC→TTT	126	(Phe)
		1120	CTA→TTA	368	(Leu)
		1141	CAC→TAC	375	His → Tyr
	RdRp core	2757	CTA→TTA	913	(His)
		2788	GGT→AGT	924	Gly → Ser
		3166	ATT→GTT	1050	Ile → Val
	3′end C-term	3925	GCC→ACC	1303	Ala→ Thr
		4110	CTG→CTA	1364	(Leu)
		4903	CTC→TTC	1629	Leu → Phe
		4992	AAG→AAA	1658	(Lys)
		5025	GTG→GTA	1669	(Val)
		5178	AAG→AAA	1720	(Lys)
		5193	AAA→AAG	1725	(Lys)

		5229	TTC→TTT	1737	(Phe)
		6229	GAG→AAG	2071	Glu→ Lys
Total number of changes (L)		**17**		**7**	
M	NSm	97	AGA→AAA	26	Arg → Lys
		342	CAC→TAC	108	His → Tyr
		372	GAG→AAA	118	Glu→ Lys
		374			
	Gn	649 (mixed)[d]	AGA→AAA	210	Arg → Lys
		716	CAG→CAA	232	(Gln)
		1017	GAT→AAT	333	Asp→ Asn
		1299	GCT→ACT	427	Ala→ Thr
		1315	GCC→GTC	432	Ala → Val
		1337	GGT→ GGA	439	(Gly)
		1480	GAG→GGG	487	Glu → Gly
		1638	CAC→TAC	540	His → Tyr
		1742	CTG→CTA	574	(Leu)
		1764	GCT→ACT	582	Ala→ Thr
		1779	GTT→ATT	587	Val → Ile
	Gc	2324	AGC→AGT	768	(Ser)
		2869	GCA→GTA	950	Ala → Val
		3288	GTA→ATA	1090	Val → Ile
		3359	ACC→ACT	1113	(Thr)
		3367	GCT→GTT	1116	Ala → Val
		3565	AGA→AAA	1182	Arg → Lys
	3′NCR	3821	A→G	---	---
		3823	T→A	---	---
Total number of changes (M)		**23**		**15**	
S	NSs	124	AGG→AGA	30	(Arg)
		188	GTT→ATT	52	Val → Ile
		279	CCA→CTA	82	Pro → Leu

		598	GAG→GAA	188	(Glu)
	Intergenic región	887	C→T	---	---
	NP	952	GTC→GTT	234	(Val)
		1645	AAC→AAT	3	(Asn)
Total number of changes (S)		**7**		**2**	
TOTAL		**47**		**24**	

[a] Definition of regions within the RNA segments. [b] Amino acid and nucleotide numbering according to the sequence of RVFV SA75, accession #: DQ375428 (segment L); DQ380189 (segment M) and DQ380175 (segment S). [c] Amino acids are represented with the 3-letter code; when the nucleotide change did not lead to an amino acid substitution (silent mutation) the corresponding residue is written between parentheses. [d] Even though position 649 in the M-segment was found to show traces of the parental nucleotide (mixed) this position was computed as amino acid changed.

e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto: No aplica

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente? Si

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

h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? No

VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? NO

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?: NO

En caso afirmativo:

i) número de copias:

ii) localización cromosómica:

iii) secuencias colindantes

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

c) Si se trata de un virus:

i) La inserción es específica ☒

ii) La inserción se produce al azar ☐

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas ☒

d) Análisis moleculares realizados relativos a la expresión del producto deseado *(PCR, Northern, secuenciación, otros)*:

iv) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación) ☒

v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA) ☒

vi) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas) ☒

Aportar toda la documentación al respecto. Los análisis serán realizados una vez se obtenga el OMG.

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: Se espera que los intercambios de segmentos den lugar a virus resultantes más atenuados in vivo

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

c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar: Sería esperable ya que se introducen mutaciones atenuadoras en cada segmento intercambiado.

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 aplica

f) Marcadores específicos del OMG: Mutaciones en los segmentos L, M y S (ver Tabla I)

2) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*): No se ha analizado a nivel genético. Se realizará una vez obtenido el OMG

3) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos: Negligible

4) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:

a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: Tras su rescate, formación de placas de lisis en cultivo celular. Detección de expresión de antígenos específicos médiate técnica western blot e inmunofluorescencia. Aislamiento en cultivo celular

b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: No aplica. No se liberará al medio ambiente

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

a) Enseñanza ☐

b) Investigación ☒

c) Desarrollo ☐

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

a) Volumen máximo en el caso de microorganismos: 15-20 mL

b) Número de plantas:

c) Número de animales: En cada experimento para analizar la respuesta inmune inducida se podrán utilizar aproximadamente 50 ratones de tipo 129Sv/Ev o BALB/c. Para analizar la patogenicidad e inmunogenicidad conferida por los virus recombinantes los experimentos se realizarán con 1 grupo de ratones control no inmunizados y al menos 4 grupos de animales inoculados con dosis diferentes (alta/baja) de los virus híbridos generados. Los ratones recibirán una única inoculación intraperitoneal y/o intranasal. La inmunogenicidad específica se evaluará mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero a diferentes días post-inoculación.

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

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

Octubre 2023-diciembre de 2025

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

Se comprobará si los virus recombinantes híbridos son atenuados en ratones inmunodeficientes A129 e inmunocompetentes. Se comprobará también su capacidad inmunogénica en ratones.

Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa *(señalar nombre y ubicación)*, y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG. En el caso de centros españoles, indicar el número de notificación si se conoce:

NO procede de otro centro

5) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo en virtud de la legislación aplicable[2] *(tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado)*:
En caso necesario el tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación y etiquetado seguirán la legislación internacional y nacional vigente para el transporte de material biológico infeccioso para humanos y animales.

[2] Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:
- **(ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas)** del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones
- **Reglamento (CE) nº** 1/2005 del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas 64/432/CEE y 93/119/CE y el Reglamento (CE) nº 1255/97**.**
- **Reglamento (CE) nº** 1946/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente [Diario Oficial L 287 de 5.11.2003].
- **Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad**. Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: https://bch.cbd.int/protocol/

6) Descripción de los métodos de manejo de los OMG *(incluyendo descripción de las fases de cultivo y concentración máxima de OMG en el cultivo)*: Fases: rescate de virus mediante transfección con plásmidos. Amplificación de stocks en volúmenes de 5-10ml. Titulación de stocks. Títulos máximos estimados en cultivo 10e6-10e7 pfu /ml. Análisis de expresión de transgenes, análisis de estabilidad de transgenes a nivel genético y fenotípico. Infecciones en cultivos para la determinación de cinéticas de crecimiento en células competentes de interferón y en células de insecto (mosquito). Tras comprobar su rescate mediante la detección de efecto citopático en cultivo celular se someterán a un pase adicional para generar un stock de título suficiente que permita realizar experimentos in vivo (concentración máxima esperada 10^7 pfu/ml)

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

Todas las manipulaciones para la obtención del OMG se realizarán en cabinas de seguridad biológica dentro del laboratorio de nivel 3 del CISA, cuyo acceso se encuentra restringido al personal ajeno al proyecto o seguridad biológica. La zona de contención biológica de 10.824 m2, posee unas características arquitectónicas y funcionales reconocidas internacionalmente para garantizar la bioseguridad.

La característica principal del laboratorio es proporcionar un grado de estanqueidad total para evitar la liberación al exterior de cualquier agente patógeno sobre el que se estén llevando a cabo trabajos de investigación. Para asegurar unas correctas medidas de seguridad, el Centro está diseñado siguiendo aspectos arquitectónicos, funcionales y buenas pautas de trabajo adecuados e integrados.

Dentro de los **aspectos arquitectónicos y estructurales**, el Centro está construido en hormigón armado hidrófugo, cuyo interior está pintado con pintura epoxídica para posibilitar las operaciones de descontaminación. Existen también ventanas blindadas de seguridad. Todas las entradas a boxes y diferentes zonas o laboratorios, así como las de emergencia, presentan puertas con cerradura de seguridad y ajuste neumático. El Centro presenta una estructura tipo “sandwich” donde las zonas de trabajo (laboratorios, animalario y entrada y salida de personal) se localizan en una planta intermedia. En la planta superior se encuentra un sistema de filtración de alta eficacia del aire mientras que la planta inferior está habilitada para los procesos de gestión de residuos sólidos y efluentes y para la entrada y salida de animales y materiales mediante sistemas SAS y *airlocks*. Para asegurar un funcionamiento correcto incluso bajo situaciones de emergencia, todos los dispositivos de seguridad se encuentran instalados de forma redundante (duplicados) o en algunos casos por triplicado.

Dentro de las **características funcionales**, se encuentran las siguientes:

- Tratamiento del **aire y ventilación**, estando las condiciones termo-higrométricas reguladas en todo momento. La humedad relativa se mantiene a niveles reducidos (35%) para evitar así que agentes biológicos aerotransportables queden fijados en codos y rugosidades del sistema de circulación del aire.
- Establecido en toda la zona biocontenida existe un **mantenimiento de presión negativa** respecto a la atmosférica en gradiente diferencial unidireccional de flujo continuo en los laboratorios y en cascada en los boxes de animales experimentación, con pasos de entre 25 y 35 Pa, generado en extracción dinámica, consiguiendo que el aire siempre circule de

zonas teóricamente menos contaminadas a más contaminadas. El 100% del aire que entra vuelve a salir por lo que en ningún momento se recircula el aire.

- El **aire de salida es filtrado** mediante un sistema simple o doble seriado de filtros H14 HEPA (High Efficiency Particulate Air) consistente en una malla filtrante con paso de poro de 99.995% para partículas de máximo poder de penetración en superficie (MPPS) (0.12 µm-0.20 µm). Existen diferentes zonas de filtración de salida independientes, correspondientes a distintas secciones del laboratorio; de esta forma en caso de problemas puede evaluarse la efectividad de la zona afectada por separado.
- El control y **tratamiento de residuos líquidos** generales tiene lugar en la planta inferior del Centro. Con carácter previo se realiza una separación del 100% de los sólidos conformados presentes en el efluente y el 50% de los sólidos en suspensión. Posteriormente se trata el efluente mediante una esterilización fisicoquímica en 3 reactores de 3 m^3 controlando temperatura, presión y pH. La temperatura se eleva por encima de 136ºC durante un tiempo aproximado de 22 minutos. La fase química se realiza mediante la inyección de peróxido de hidrógeno durante el tratamiento térmico. Existe un sistema adicional de tratamiento de efluentes en casos de emergencia por tratamiento químico.
- Para el control y **tratamiento de sólidos biocontaminados** existe un horno crematorio pirolítico, diferentes autoclaves de vapor y la presencia de sistemas de descontaminación química (SAS o airlocks) a base de peróxido de hidrógeno gas o mediante ducha química superficial.

A pesar de todos los recursos tecnológicos y de ingeniería, el buen funcionamiento del área de biocontención se culmina con una correcta actuación del personal trabajador correctamente formado, adoptando de forma obligada medidas de prevención de riesgos laborales.

Controles de entrada y salida del laboratorio. La entrada al laboratorio está controlada y supervisada rigurosamente. Sin acreditación correspondiente, no está permitido el acceso. Los visitantes han de ir acompañados en todo momento por el personal de Seguridad Biológica. Una vez en el interior es necesario pasar por un vestuario para liberarse de toda la ropa y objetos personales antes de acceder a la zona biocontenida. El acceso a la zona de Alta Contención Biológica (NCB3), presenta un riesgo especial para los trabajadores por lo que a esta zona sólo puede acceder personal especialmente formado y autorizado para trabajar en estas condiciones. Una serie de vestuarios a la entrada y duchas a la salida aseguran la descontaminación obligatoria del personal. Cada persona que abandone el laboratorio deberá seguir escrupulosamente unas pautas de descontaminación, entre las que se incluye la obligación de descontaminación por arrastre y dilución gracias a la toma de una ducha automática de agua de 3 minutos de duración. Bajo ningún concepto es posible extraer cualquier objeto del interior del laboratorio sin la descontaminación pertinente.

Cumplimiento de procedimientos de trabajo y seguridad. Resulta imprescindible por parte de los trabajadores, el cumplimiento de los procedimientos de trabajo (métodos, procedimientos normalizados de trabajo, instrucciones par aseguramiento de calidad, etc.) existentes y por lo tanto la información sobre los riesgos de los productos y operaciones, y las medidas de seguridad y protección a aplicar. Dentro de ellas, está especialmente controlado el uso obligatorio de equipos de protección individual (EPI), para evitar de forma accidental, inhalaciones, ingestiones, cortes, pinchazos, arañazos, mordeduras o picaduras cuando se enfrentan a situaciones especiales de

riesgo biológico. Para ello el trabajador es formado, informado y acepta dejando constancia documental del cumplimento de las normas y cuarentenas establecidas (se adjunta formato), destacando las siguientes:

- Las normas que señalan la protección de las heridas y lesiones de las manos antes de iniciar la actividad laboral.
- Las normas que limitan o prohíben el trabajo directo con animales y/o manejo de equipos contaminados al personal que presenta lesiones cutáneas que no se pueden cubrir.
- La utilización constante de guantes de protección en la manipulación de muestras biológicas, objetos, materiales o superficies contaminadas con fluidos biológicos, etc.
- La prohibición de comer, beber, fumar, aplicarse cosméticos o llevar lentes de contacto en las áreas de trabajo.
- La obligación del uso de batas de protección, mascarillas y protección ocular (entre otras) en aquellas operaciones que pueden implicar salpicaduras de sangre o fluidos.
- El seguimiento estricto de las instrucciones que contemplan la actuación en caso de accidente o incidente en el que intervenga la presencia de un agente biológico.
- El seguimiento de las situaciones de riesgo adicional que podría suponer a aquellos trabajadores especialmente sensibles (patologías previas, trastornos inmunitarios, embarazo, lactancia, discapacidad, etc.).
- El uso de ropa de trabajo especial como pijamas, camisetas, monos, ropa interior, zuecos o zapatillas, botas, etc.
- El cambio de ropa en los accesos y salidas a la zona de alta seguridad.

De igual manera y en cumplimiento de la legislación vigente, los trabajadores que vayan a desarrollar cualquier actividad en la zona de biocontención, se encuentran obligados a recibir formación para el desarrollo de sus tareas que incluyen los siguientes aspectos: agentes biológicos a los que están expuestos y grupo de riesgo al que pertenecen, prácticas de trabajo seguras, características y uso correcto de los equipos de protección individual [R.D. 664/1997].

Establecimiento de cuarentenas. Finalmente, y en cumplimiento de la legislación y normativa internacional de la OIE y la FAO, todo trabajador de la zona de Contención está sujeto a cuarentenas especiales entendiendo éstas como el espacio de tiempo que transcurre entre el abandono de la zona de Riesgo y todo contacto con animales sensibles de contraer enfermedades desarrolladas/reproducidas en el Centro.
Estas cuarentenas varían entre los 3 y 5 días como mínimo. De igual manera que con los equipos de protección individual, el trabajador deja constancia documental de cumplimiento de esta circunstancia (se adjunta formato).

El box de experimentación donde se van a desarrollar las actividades con los OMGs aquí descritos además de las medidas reflejadas ofrece:

- Inactivación de residuos en CSB mediante procedimientos normalizados.
- Inactivación/desinfección de contenedores en las duchas de box.
- Autoclaves de doble frontera animalario/laboratorios y 2º interior NCB3/exterior NCB3.
- Validaciones microbiológicas de todos los procesos de biodescontaminación por gas y calor mediante *Geobacillus stearothermophilus* en población de 10^6
- Equipo de 8 personas de técnicos especializados de seguridad biológica.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:
El CISA está ubicado a 700 m de la localidad de Valdeolmos que presenta una baja densidad de población (< 1.000 habitantes). No existen próximos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza. El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al CISA es prácticamente inexistente por las siguientes razones:
   - El laboratorio está equipado con medios e infraestructura de biocontención superiores a los establecidos para las operaciones confinadas de Tipo 3, en la legislación de aplicación y normativas nacionales e internacionales.
   - La Instalación se encuentra validada por empresa externa, inspeccionada y declarada como nivel 3 de contención biológica por el Instituto Regional de Seguridad y Salud en el Trabajo de la CAM, auditada interna y externamente en riesgo biológico por empresas ajenas, cualificada anualmente por empresa especializadas en CSB y filtración y verificada por el equipo propio de seguridad biológica periódicamente de forma rutinaria y frente a operaciones de mantenimiento correctivo.
   - Se dispone de procedimientos de bioseguridad por actividades tales como, investigadores, animalario, seguridad biológica, mantenimiento, limpieza, vigilancia perimetral y equipo médico, donde se especifican las normas de bioseguridad para descontaminaciones, gestión de residuos, operaciones de mantenimiento correctivo, envíos y recepción de muestras, transporte interior, uso de *airlocks* y SAS, etc.
   - Se dispone de un programa mensual, bimestral, trimestral, cuatrimestral, semestral y anual de actuaciones de verificación y seguimiento de instalaciones críticas.
   - Se dispone de documentos de control de acciones, trabajos y seguimiento de parámetros de bioseguridad.
   - Se dispone de estación informática de control y seguimiento de parámetros esenciales de bioseguridad e infraestructura de mantenimiento redundante (interior NCB3-exterior).
   - Se dispone de estación informática de seguimiento de parámetros para tratamiento de efluentes redundante (interior NCB3 y exterior).
   - Se dispone de redundancia en suministro eléctrico con dos líneas de alta tensión, dos transformadores de baja autoconmutados, dos grupos electrógenos y dos UPS /SAI.
   - Todas las operaciones de mantenimiento preventivo se encuentran verificadas.
   - Se realiza tratamiento de residuos “in situ”.
   - La instalación dispone de un plan de emergencias de actuación en caso de accidente biológico y plan de evacuación sobre incidentes en incendios, aviso de bomba, accidente biológico químico y evacuación de accidentados.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes: Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos. Con fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.

3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista: Las operaciones indicadas se desarrollarán en un box de experimentación en contención biológica de nivel 3

(NCB3). Toda la Instalación se encuentra autorizada para trabajos con OMG Tipo 3 (A/ES/00/I-1) con fecha de Resolución de 5 de diciembre de 2000 por la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental; Subdirección General de Impacto Ambiental y Prevención de Riesgos.

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio: Las normas básicas de bioseguridad a seguir son las recogidas en el *Manual de Bioseguridad para trabajos en el animalario con fiebre del Valle del Rift* y *Manual de procedimientos Generales de Bioseguridad para trabajos con RVF*. El personal tiene experiencia en trabajos en box NCB3 y técnicas de laboratorio con la infraestructura específica.

2) Formación del personal adscrito: El personal actuante ha sido formado antes de iniciar la actividad mediante un curso teórico práctico sobre Bioseguridad en contención 3 en el laboratorio y Animalario específico. Fueron sometidos a test de comprensión. El personal recibe un curso de reciclaje en bioseguridad anualmente.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación: Limpieza: Se dispone de personal entrenado específico de limpieza para áreas NCB3 comunes. Se dispone de personal entrenado y acreditado en trabajos de animalario. Se dispone de procedimientos de desinfección, descontaminación y esterilización que son llevados a cabo por personal técnico especializado en bioseguridad (Técnicos Superiores de Laboratorio y Titulados Superiores en Ciencias).

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento: Llevado a cabo por personal especializado en mantenimiento 24horas / 365 días año.

5) Programas de inspección y control del confinamiento: Llevado a cabo por técnicos especializados en Seguridad Biológica.

GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1) Encargado de la gestión de residuos:

   a) gestión interna: SÍ ☒ NO ☐

   b) gestión por una empresa externa: SÍ ☒ NO ☐

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

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

Solidos: Dos ciclos por autoclave de vapor 134ºC - 18 minutos. Tratamiento químico superficial por ducha química o gas en SAS o Airlocks. Tratamiento químico por inmersión en Dunk Tank
Líquidos: Tratamiento termo-químico de efluentes
Aire: Filtración HEPA H14 simple o doble seriada. Descontaminación por inyección de gas (formaldehido o peróxido de hidrógeno gas) antes de su retirada de caja.- Sistema adicional bag in – bag out. 2º Tratamiento del filtro por autoclave de vapor antes de su salida del NCB3.
Exterior: Una vez tratados "in situ", retirada de vidrio y en su caso de residuos biosanitarios especiales o clase II por gestor acreditado para tratamiento en incineración o autoclave de vapor.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente: Indicadas en Plan de Evacuación

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese): Reflejados en procedimientos específicos para RVFV. Reflejados en Plan de Evacuación

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores: Manual de bioseguridad para animalario RVFV. Plan de Evacuación. Procedimientos de Bioseguridad específicos para RVFV en animalario

4) Planes de emergencia: Presentado en Protección Civil y expuesto en el acceso a la zona NCB3 para información a personal específico. Las acciones técnicas son llevadas a cabo por personal CISA-INIA de Dirección, de Seguridad Biológica y de Mantenimiento para control o parada de equipamiento auxiliar (calderas, bombas, equipos de frio o torres de refrigeración, etc.), bajo indicación y supervisión del Jefe de Servicio de Seguridad Biológica.

EVALUACIÓN DE RIESGO DE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

1) Entidad

   Nombre: Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA); Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA); Ministerio de Ciencia e Innovación

   Dirección postal: Carretera de Algete a El Casar de Talamanca s/n; Valdeolmos - Alapardo; 28130 Madrid

2) Representante legal de la entidad
   Nombre y apellidos: Esther Esteban Rodrigo
   NIF:05271582M
   Cargo: directora del INIA
   Tel: 913473900
   Fax:
   Correo electrónico: Esther.esteban@inia.csic.es

3) Responsable científico de la actividad
   Nombre y apellidos: Alejandro Brun Torres
   NIF: 02855574D
   Cargo: Investigador científico
   Tel:916202300
   Fax:916202247
   Correo electrónico: brun@inia.csic.es

4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
   Nombre y apellidos: Laura Pérez Palancar
   NIF: 53043241C
   Cargo: Jefa de Area de Animalario y Seguridad Biológica
   Tel: 916202300
   Fax: 916202247
   Correo electrónico: laura.perez@inia.csic.es

5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: Laura Perez Palancar

II.

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

(En el caso de que se notifiquen varias actividades de tipo 1, deberá rellenarse este apartado y adjuntar un cuadro resumen en que se recojan todas las actividades, según el modelo que figura en el anexo).

1) Objetivo de la actividad: Evaluar la contribución a la atenuación viral de mutaciones presentes en la variante 40Fp8 del virus de la fiebre del Valle del Rift mediante el intercambio de segmentos completos de RNA. En este proyecto se quiere obtener una definición más precisa del fenotipo provocado por dichas mutaciones, empleando el clon infectivo correspondiente al virus parental 56/74 así como a su variante 40Fp8. Utilizando ambos sistemas, estudiar la contribución de las mutaciones presentes mediante intercambios de segmentos vírales entre ambos virus parental y variante (reassortants). Para ello se realizarán ensayos de caracterización fenotípica in vitro (crecimiento en cultivo, estabilidad en cultivo) o in vivo (nivel de atenuación, inmunogenicidad etc).

2) Duración prevista de la actividad: Octubre 2023- Diciembre 2025

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

III. EVALUACIÓN DE RIESGO

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

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

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

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

a) Organismo receptor.

Se considera **organismo receptor** al virus de la fiebre del Valle del Rift de la cepa virulenta 56/74. Este virus se obtiene a partir de un clon infectivo mediante transfección de células eucariotas empleando cDNA del virus clonado en tres plásmidos de ADN. Este virus es virulento (causa patología en animales rumiantes) y puede provocar clínica de distino grado de severidad en humanos

b) Organismo donante.

Se considera **organismo donante** al virus de la fiebre del Valle del Rift de la variante atenuada 40Fp8. Este virus se obtiene, asimismo, a partir de un clon infectivo mediante transfección de células eucariotas empleando cDNA correspondiente a genoma del virus clonado en tres plásmidos. El virus es completamente atenuado en animales rumiantes y en modelos murinos, incluso en ratones transgénicos altamente sensibles a infecciones virales.

c) Inserto.

Segmentos genómicos completos S, M o L de la variante atenuada 40Fp8

d) Vector.

Para la generación de los segmentos de ARN virales se utilizan al menos tres plásmidos de ADN pBSK+(L); pBSK+(M); pBSK+(S). Todos ellos contienen la secuencia promotora (P) de la RNA polimerasa del fago T7 y secuencias de terminación (T) de transcripción junto con la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV). Entre ambas secuencias reguladoras se insertan las secuencias antigenómicas de los tres segmentos del ARN del virus (L, M y S). La transfección de los tres plásmidos en células BSR/T7 (que expresan establemente la RNApol T7) permitiría el rescate de virus recombinantes.

e) Organismo modificado genéticamente resultante.

En el genoma tripartito (S, M y L) del virus 56/74 (wt) se sustituirán segmentos de RNA completos por los correspondientes del virus 40Fp8 para generar los siguientes virus híbridos (reassortants):

a) r56/74 L[40Fp8]/M[wt]/S[wt]

b) r56/74 L[wt]/M[40Fp8]/S[wt]

c) r56/74 L[wt]/M[wt]/S[40Fp8]

d) r56/74 L[40Fp8]/M[40Fp8]/S[wt]

e) r56/74 L[40Fp8]/M[wt]/S[40Fp8]

f) r56/74 L[wt]/M[40Fp8]/S[40Fp8]

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

Los virus que se generan contienen segmentos de RNA procedentes de la variante atenuada 40Fp8. En los tres segmentos de ARN genómico de esta variante se han encontrado mutaciones atenuadoras. Es esperable que el intercambio de segmentos atenúe el (los) virus resultante(s) por lo que **no se esperarían a priori efectos nocivos para humanos ni animales**.

g) Efectos para el medio ambiente

Su uso está confinado a las actividades de experimentación en un laboratorio de nivel de contención biológica 3 (NCB3), por lo que no deberían tener **ningún efecto sobre el medio ambiente**.

2) Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

(Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 4 de la Directiva 2009/41/CE y, en caso de ser aplicable, otros sistemas de clasificación nacionales e internacionales existentes, por ejemplo, la Directiva 2000/54/CE sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo).

Tipo 1 ☐

Tipo 2 ☐

Tipo 3 ☒

Tipo 4 ☐

3) Probabilidad de que se produzcan efectos nocivos y gravedad de los mismos, en función de: Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

a) Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental). Todas las actividades que implican la manipulación, propagación y administración de los virus generados se encuentran confinadas en nivel de seguridad BSL3 y/o BSL3+. La exposición humana se reduce al máximo mediante el empleo de medidas de protección individual para el personal de laboratorio involucrado, junto con la manipulación obligatoria en cabinas de seguridad exclusivas habilitadas a tal efecto en nivel de seguridad BSL-3+. La experimentación animal se lleva a cabo con las mismas medidas de protección personal en boxes de uso exclusivo que se descontaminan a su finalización en atmósfera de peróxido de hidrógeno.

b) Concentración y escala utilizadas. La concentración de los virus generados será de 10^8 pfu/ml como máximo.

c) Condiciones de cultivo (se tendrá en cuenta el entorno potencialmente expuesto, la presencia de especies susceptibles, supervivencia del OMG y efectos sobre el entorno físico). Se considera que la exposición al entorno está altamente minimizada por su confinamiento y la restricción de su manipulación dentro de un laboratorio de alta seguridad biológica.

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

Actividad confinada de tipo 3, grado suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente. Las medidas de confinamiento serán las mismas empleadas para trabajar con el virus parental virulento RVFV-56/74, de grupo de riesgo 3, y declaración obligatoria a la OMSA. Con este aislado el grupo lleva más de 20 años trabajando en el Centro en las condiciones que ofrece el sistema de alta seguridad biológica del CISA sin ningún tipo de escape o inoculación accidental, avalando la idoneidad de las mimas.

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

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

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

El Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) está ubicado a 700 metros de la localidad de Valdeolmos. El centro presenta un conjunto de instalaciones reunidas en un solo edificio subdividido en área administrativa, zona NCB2 y zona NCB3. Actualmente trabajan alrededor de 170 personas en las diferentes áreas. Valdeolmos es un municipio de bajo número de habitantes (< 1000). Se asienta en una penillanura a una altitud de 685 m sobre el nivel del mar rodeado de tierras de cultivo de secano (trigo, centeno, avena) y no se encuentra cercana ninguna explotación ganadera. No existen en sus alrededores riesgos potenciales que puedan condicionar sus actividades (centrales eléctricas, nucleares, embalses, o instalaciones militares). No hay zonas boscosas en los alrededores afectando al edificio ni zonas inundables o anegables. Es zona de especial protección de aves (ZEPA).

b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

Un accidente que implique un escape de material biológico peligroso puede producirse ya sea por negligencia del manipulador o intencionadamente. Toda salida de personal del área de contención biológica implica en todo caso una descontaminación superficial por lavado de manos, boca y fosas nasales, cambio de ropa de trabajo y ducha jabonosa obligatoria de tres minutos para minimizar un arrastre del patógeno por el experimentador hacia el exterior. (En caso de trabajos con animales en boxes de seguridad la salida del mismo se produce previa ducha del experimentador tras la descontaminación de las prendas de protección que quedan en el interior para su posterior autoclavado y limpieza). En el caso de manipulación de virus OMGs los residuos sólidos de laboratorio son sometidos a esterilización por autoclaves (homologados y validados semestralmente). Los residuos líquidos contaminados con virus se diluyen con Virkon. El trabajo con virus se lleva a cabo en cabinas de seguridad de clase II, revisadas y validadas semestralmente, y cuyas superficies de trabajo se descontaminan con Perasafe y luz UV después de cada uso.

c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales. Explicados anteriormente y desarrollados en el Plan de emergencias y evacuación y en la parte A (anexo de documentación correspondiente a la solicitud)

d) Planes de emergencia.

El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud. Presentado en Protección Civil y expuesto en el acceso a la zona NCB3 para información a personal específico. Las acciones técnicas son llevadas a cabo por personal CISA-INIA de Dirección, de Seguridad Biológica y de Mantenimiento para control o parada de equipamiento auxiliar (calderas, bombas, equipos de frio o torres de refrigeración, etc.), bajo indicación y supervisión del Jefe de Servicio de Seguridad Biológica.