



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

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Responsables de la actividad

a. Entidad

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

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

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Esther Esteban Rodrigo

NIF: 05271582M

Cargo: Directora del INIA

Tel:

Correo electrónico: esther.esteban@inia.es

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Aitor Nogales González

NIF: 51986340S

Cargo: Científico titular CSIC

Tel: 91 6202300

Correo electrónico: nogales.aitor@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: 91 6202300

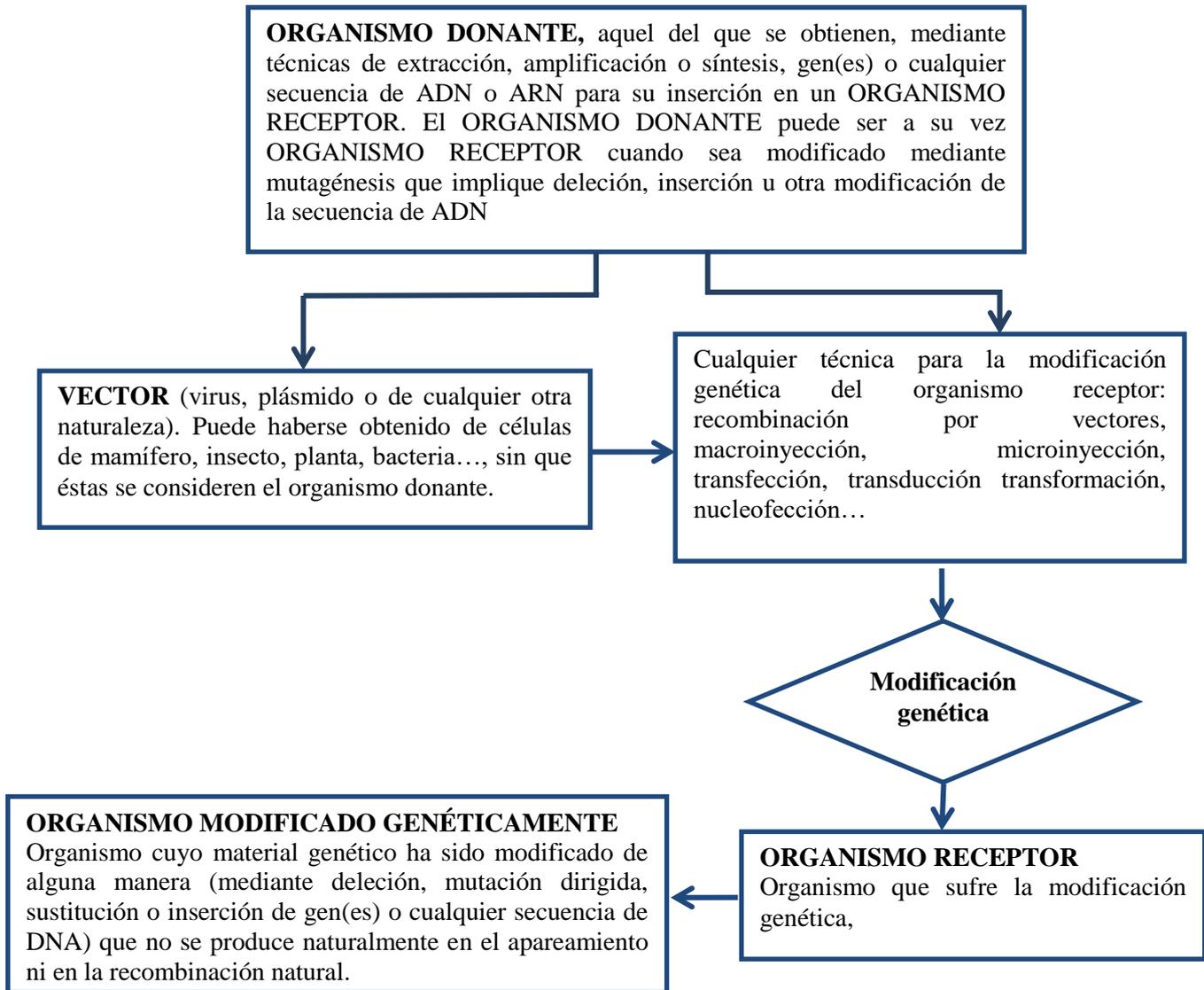
Correo electrónico: laura.perez@inia.csic.es

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

Laura Pérez Palancar



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





II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

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

SI NO

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

- Nombre de la convocatoria:

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

- Organismo financiador:

Otro tipo de financiación²

x. El proyecto concedido tiene fondos europeos. La convocatoria: ISIDORE Joint Research Activities programme 2023. Se trata de un call interno dentro del proyecto ISIDORE (<https://isidore-project.eu/>). No se acompaña de documentación específica, porque actualmente solo tenemos la notificación formal de la concesión (octubre 2023).

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-..):

Notificación A/ES/00/I-01

- Fecha de autorización de la instalación:

04/12/2001

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:

El virus de la gripe A o B (IAV o IBV, respectivamente), pertenece a la familia Orthomyxoviridae. Se trata de virus con envuelta de RNA monocatenario, segmentado (8 segmentos) y de polaridad negativa. En la envuelta se encuentran las dos glicoproteínas del virus la hemaglutinina (HA o H) y neuraminidasa (NA o N). IAV tiene subtipos determinados por estos antígenos (HA y NA), habiéndose detectado por el momento 18 subtipos distintos de la proteína HA (H1 a H18) y 11 subtipos de la proteína NA (N1 a N11). En el caso de IBV, existen dos linajes (B/Victoria y B/Yamagata)

La influenza es una enfermedad respiratoria contagiosa provocada por los virus de la influenza o gripe. Datos de la OMS indican que la gripe estacional es responsable de unos mil millones de casos al año (3-5 millones de casos graves), causando entre 290 000 y 650 000 muertes respiratorias al año. Actualmente entre humanos circulan los subtipos H1N1 y H3N2 de gripe A. El A(H1N1) también se conoce actualmente como A(H1N1)pdm09, ya que causó la pandemia de 2009 y sustituyó al virus A(H1N1) que circulaba hasta entonces. Todas las pandemias conocidas han sido causadas por virus gripales de tipo A. Además circulan en humanos dos linajes de gripe de tipo B: B/Yamagata y B/Victoria. Por otra parte, los brotes de gripe aviar del año 2021-2022 en Europa han hecho saltar las alarmas por la posible emergencia de nuevos virus pandémicos. Estos brotes fueron de especial relevancia porque afectaron a diferentes granjas y aves silvestres de toda España, y también por la aparición de casos en humanos en Europa y otras regiones del mundo. Cabe destacar que las últimas pandemias de gripe de las que se tienen datos, incluida la gripe española de 1918 (50 millones de muertos) han tenido como origen o la participación de virus de gripe aviar. El objetivo final de este proyecto y de los trabajos descritos aquí es el estudio de la enfermedad así como la identificación y/o desarrollo y/o evaluación de herramientas terapéuticas para prevenir (vacunar) o tratar (anticuerpos, compuestos antivirales) las infecciones por gripe. Para ello, se pretenden generar mediante técnicas de genética reversa desarrollar virus recombinantes de gripe estacional (A/H1N1, A/H3N2 y B) o aviar (Subtipos H5Nx, H7Nx, H3N2, H9N2). Se generarán virus recombinantes similares a los que circulan actualmente, tanto

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



la versión silvestre o wildt-type como versiones que expresen un gen reportero. La expresión de genes reporteros, aunque atenúan el virus, también facilitan su identificación y múltiples ensayos. Por este motivo se prefiere generar los virus por técnicas de genética reversa, en lugar de simplemente usar aislados naturales. Este proyecto se inicia con fondos europeos (ISIDORE Joint Research Activities programme) dentro de un consorcio y proyecto colaborativo: Optimizing reporter-expressing viruses for studies of influenza virus and Rift Valley fever virus infection.

Cabe destacar que los virus que se generarán ya existen en otros laboratorios, y por tanto no se prevé ningún problema en su generación, manipulación o seguridad distinto al que pueda haber en otros lugares. No obstante, consideramos que es más práctico desarrollar nosotros mismos las herramientas por asuntos relacionados con MTAs, patentes (incluidas futuras patentes), envíos entre países de agentes infecciosos, etc. La generación de virus recombinantes estacionales, también podría considerarse como una actividad de tipo 2. No obstante, dado que la generación y uso de virus de gripe aviar debe ser considerada como de tipo 3, y que los trabajos se llevarán a cabo en el mismo lugar, se entrega un único formulario como autorización de tipo 3.

Organismo donante: genes de IAV o IBV (sintetizados por una empresa del sector) y genes reporteros (obtenidos por PCR de un plásmido) como NanoLuc luciferasa o proteínas fluorescentes típicas (GFP, Venus, mCherry). Dado que todos los genes serán sintetizados u obtenidos a partir de plásmidos, no se trabajará o manipulará directamente el organismo donante.

Organismo receptor: Generación de virus recombinantes de IAV o IBV mediante técnicas de genética reversa. Nótese, que en este caso el organismo receptor y el OMG, pueden considerarse en esencia lo mismo.

OMGs: Nuevos virus recombinantes de IAV/IBV serán generados mediante técnicas de genética reversa, ya establecidas en el campo. Algunos de los virus recombinantes también expresarán un gen reportero para seguir la infección de células. Por tanto el organismo receptor y el OMG son esencialmente lo mismo, puesto que los virus recombinantes serán generados/rescatados mediante transfección de plásmidos y no se modifica directamente ningún virus vivo, se genera de cero.

Las técnicas de genética reversa, son detalladas en las correspondientes secciones (ver también las referencias aportadas) y se basan en metodologías ya descritas y establecidas en el campo. Estas técnicas se han utilizado para el rescate de virus recombinantes que permitan el estudio de las infecciones por IAV/IBV, la generación de vacunas, etc.

1: Martínez-Sobrido L, DeDiego ML, Nogales A. Reverse genetics approaches for the development of new vaccines against influenza A virus infections. *Curr Opin Virol.* 2020 Oct;44:26-34. doi:10.1016/j.coviro.2020.06.001. Epub 2020 Jun 27. PMID: 32599532.

2: Blanco-Lobo P, Nogales A, Rodríguez L, Martínez-Sobrido L. Novel Approaches for The Development of Live Attenuated Influenza Vaccines. *Viruses.* 2019 Feb 22;11(2):190. doi: 10.3390/v11020190. PMID: 30813325.

3: Nogales A, Perez DR, Santos J, Finch C, Martínez-Sobrido L. Reverse Genetics of Influenza B Viruses. *Methods Mol Biol.* 2017;1602:205-238. doi:10.1007/978-1-4939-6964-7_14. PMID: 28508223.



4: Nogales A, Martínez-Sobrido L. Reverse Genetics Approaches for the Development of Influenza Vaccines. Int J Mol Sci. 2016 Dec 22;18(1):20. doi:10.3390/ijms18010020. PMID: 28025504.

5: Breen M, Nogales A, Baker SF, Martínez-Sobrido L. Replication-Competent Influenza A Viruses Expressing Reporter Genes. Viruses. 2016 Jun 23;8(7):179. doi: 10.3390/v8070179. PMID: 27347991.

El proyecto concedido tiene fondos europeos. La convocatoria: ISIDORE Joint Research Activities programme 2023. Se trata de un call interno dentro del proyecto ISIDORE (<https://isidore-project.eu/>). No se acompaña de documentación específica, porque actualmente solo tenemos la notificación formal de la concesión (octubre 2023).

Junto con la documentación se adjunta:

- Dual-Use Quicksan (<https://dualusequicksan.com/en/>). The purpose of this online Dual-Use Quicksan is to identify potential dual-use aspects in research. In addition, this tool contributes to stimulate dual-use awareness among researchers. The Dual-Use Quicksan and the results can be used for consultation about research that contain or may contain dual-use characteristics and how to deal with it carefully.

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



-Especificar el nombre científico y común:

Influenza A virus (IAV) o gripe A e Influenza B virus (IBV) o gripe B.

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i) Técnicas de aislamiento: Los virus silvestres son generalmente aislados en cultivos celulares (células MDCK o Vero) o en huevos, a partir de muestras de diversa procedencia dependiendo del organismo infectado. Los genes de los aislados naturales requeridos para el trabajo, serán sintetizados de novo (Biomatik o GenScript) como se indica en las correspondientes secciones. Los virus recombinantes (OMGs) serán obtenidos mediante la transfección de células, con 8 plásmidos que codifican para el genoma completo del virus. Posteriormente, el virus será recuperado del sobrenadante de los cultivos celulares y los virus recombinantes (con o sin gen reportero) rescatados, serán utilizados para infectar cultivos de células permisivas. **Al igual que los virus silvestres, los virus recombinantes generados (OMG y organismo receptor) pueden ser aislados en cultivos celulares o huevos. También pueden ser clonados mediante ensayos de placa, donde el medio líquido es sustituido por un medio sólido o semisólido, de tal manera que pueden aislarse clones individuales. Además, en el caso de los virus que expresen un gen reportero, este puede ser utilizado para aislar e identificar el virus, bien mediante visualización directa en un microscopio de fluorescencia en el caso de que el virus exprese una proteína fluorescente o mediante cuantificación de la actividad de la luciferasa en un lector de placas.**
- ii) Técnicas de identificación: PCR, secuenciación, western blot, microscopía de fluorescencia, cuantificación de luciferasa, cultivos celulares (efecto citopático en cultivos celulares)..
- iii) Técnicas de identificación:
- iv) Marcadores genéticos: Las secuencias de los virus silvestres son públicas y pueden encontrarse en bases de datos como las alojadas en “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI) o GISAID. En el caso de los virus recombinantes que expresen un gen reportero, serán introducidos cambios en el segmento 8 (NS) para introducir el gen reportero, que permitirán diferenciar los virus recombinantes de los aislados naturales.
- v) Marcadores fenotípicos: Los aislados naturales al igual que los virus recombinantes (OMGs) generados causan un efecto citopático en algunas células de mamíferos (MDCK, Vero, etc) y aves, (DF1, etc) además de inducir cambios en la morfología celular como consecuencia de la infección. En el caso de los virus que expresen genes reporteros, estos servirán también como marcador fenotípicos, observándose en cultivos celulares la expresión del gen reportero (bioluminiscencia o fluorescencia).
- vi) Estabilidad genética: La estabilidad genética de los virus recombinantes obtenidos por genética reversa, se espera similar o igual al de los aislados naturales u otros virus rescatados mediante genética reversa.

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

SI x

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



Todas las líneas celulares que se utilizan son testadas para evaluar la presencia de micoplasmas. En especial las que se utilizan para rescatar/generar virus recombinantes o generar stocks de trabajo. Además las líneas celulares se mantienen en presencia de antibióticos para evitar contaminaciones. Igualmente, las células son examinadas en un microscopio antes de su uso, para verificar el buen estado de las mismas. Por tanto, las líneas celulares utilizadas están libres de agentes biológicos contaminantes.

NO

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

c. Modificación genética anterior:

SI

- Describir:

No Aplica, los virus serán generados a partir de genes sintetizados.

- 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):

El virus de gripe A y B estacional se consideran grupo de riesgo 2. Los virus de gripe aviar se consideran de grupo de riesgo 3. El virus inactivado no se considera patógeno.

La infección por IAV o gripe produce enfermedad respiratoria o gastrointestinal de mayor o menor gravedad dependiendo del subtipo de virus, la especie infectada, y el estado de salud del sujeto infectado. La infección también puede ser asintomática. Gripe causa una infección contagiosa que se caracteriza por la aparición de fiebre, pudiendo ir acompañada de escalofríos, sudoración, cefaleas, dolores musculares, astenia, anorexia, conjuntivitis y/o síntomas respiratorios (congestión nasal, dolor de garganta, tos seca). Pueden producirse complicaciones respiratorias (neumonía, bronquitis, sobreinfecciones bacterianas broncopulmonares, sinusitis), y menos frecuentemente cardiovasculares o neurológicas. También puede producirse deshidratación y empeoramiento de condiciones médicas crónicas preexistentes, como asma, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), fibrosis quística, o diabetes. La mayor parte de la población tiene niveles de protección alta/moderada frente a la gripe estacional por haber recibido la vacuna o infecciones anteriores.

SI

Para:

Humanos	<input checked="" type="checkbox"/>
Animales	<input checked="" type="checkbox"/>



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:

El grupo de investigación del CISA-INIA/CSIC y el investigador responsable que envía la solicitud posee una dilatada experiencia (más de 20 años) en trabajos de investigación, y actividades científicas y técnicas utilizando diversos agentes virales de relevancia en sanidad animal y humana, incluyendo múltiples tipos de virus de la gripe (humana, canina, equina, aviar, porcina, etc). Además se cuenta con gran experiencia en técnicas de genética reversa o el desarrollo de herramientas biotecnológicas. Los virus que serán generados, ya han sido generados en otros laboratorios anteriormente, como indicado anteriormente, resulta más fácil y conveniente generarlos nosotros directamente que obtenerlos de otros laboratorios. Los genes que serán sintetizados corresponden a virus de la gripe que están circulando actualmente en la naturaleza o entre humanos.

Aclaración para punto e. La reversión a un virus patógeno implica muchos cambios en el genoma, y para ello el virus debe propagarse muchas veces en cultivos celulares u otros modelos in vivo. Otro mecanismo de reversión es la coinfección del mismo cultivo celular con distintos tipos de IAV. Dado que el virus SOLO será propagado a pequeña escala para obtener un stock de trabajo y que NO se realizarán coinfecciones entre cepas virulentas y avirulentas, el riesgo de reversión a patogenicidad es mínimo o inexistente.

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:



La exposición a temperaturas iguales o mayores a 37°C, baja humedad, luz ultravioleta, o a agentes químicos reduce drásticamente la capacidad de supervivencia de gripe fuera de las condiciones de cultivo.

iii) Posibles nichos ecológicos:

Los mismos que los aislados naturales de gripe. El virus de la gripe tiene un gran rango de hospedador, pudiendo infectar diversas especies de aves (silvestres o domésticas) y mamíferos (humanos, cerdos, caballos, perros, gatos, fauna silvestre, etc) dependiendo del tipo y subtipo de gripe. No obstante, la actividad se va a llevar a cabo en un laboratorio del CISA-INIA-CSIC, instalación con nivel de bioseguridad tipo 3. El OMG estará confinado (y utilizado) a este espacio y no saldrá del mismo.

iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

Los mismos que los aislados naturales de gripe. Después de infectar un nuevo hospedador se producen nuevas partículas infecciosas en 12-48 horas, dependiendo del hospedador y el tipo y subtipo de virus. No obstante, la actividad se va a llevar a cabo en un laboratorio del CISA-INIA-CSIC, instalación con nivel de bioseguridad tipo 3.

h. Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

No aplica



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Como indicado, el virus de la gripe tiene un gran rango de hospedador, pudiendo infectar diversas especies de aves y mamíferos, dependiendo del tipo y subtipo de gripe. No obstante, la actividad se va a llevar a cabo en un laboratorio del CISA-INIA-CSIC, instalación con nivel de bioseguridad tipo 3. El OMG estará confinado a este espacio y no saldrá del mismo.

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

El virus de la gripe estacional o aviar de los subtipos indicados en esta aplicación, se encuentran distribuidos globalmente y pueden infectar (dependiendo de la cepa y tipo) una gran cantidad de especies de mamíferos y aves.

j. Hábitat natural del organismo:

La distribución de la gripe estacional y aviar es global y se encuentra en todos los continentes y en ambos hemisferios.

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

-Especificar el nombre científico y común:

Influenza A virus (IAV) o gripe A e Influenza B virus (IBV) o gripe B.

Los genes a partir de los cuales serán generados los virus recombinantes serán sintetizados por empresas del sector u obtenidos de plásmidos (genes reporteros). Por tanto el organismo donante no será utilizado directamente.

Los genes reporteros se obtienen directamente de plásmidos comerciales. Las proteínas bioluminiscentes (NanoLuc Luciferasa) o fluorescentes (Venus, GFP, mCherry) fueron aisladas de diversos organismos y posteriormente sus propiedades han sido optimizadas.

GFP (green fluorescent protein): Proviene originalmente de *Aequorea victoria*.

Venus: Es una modificación de GFP para incrementar la intensidad y estabilidad de la señal.

mCherry: Proviene originalmente de *Discosoma striata*.

NanoLuc luciferasa: Proviene de deep-sea shrimp *Oplophorus gracilirostris*.



SI Para:

- Humanos
- Animales
- Plantas
- Otros

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

No

NO

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

SI NO

NOTA: La reversión a un virus patógeno implica muchos cambios en el genoma, y para ello el virus debe propagarse muchas veces en cultivos celulares u otros modelos in vivo. Otro mecanismo de reversión es la coinfección del mismo cultivo celular con distintos tipos de IAV. Dado que el virus SOLO será propagado a pequeña escala para obtener un stock de trabajo y que NO se realizarán coinfecciones entre cepas virulentas y avirulentas, el riesgo de reversión a patogenicidad es mínimo o inexistente.

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

-El virus de la gripe tiene un genoma de ARN de polaridad negativa y segmentado. El genoma está compuesto por 8 segmentos. Los segmentos se sintetizarán de novo por empresas y clonados en plásmidos para rescatar los virus recombinantes. Los genes reporteros serán obtenidos de plásmidos comerciales mediante PCR utilizando cebadores específicos

-Además se usará un segmento 8 (que codifica para la proteína NS1 y NEP) modificado que contengan la secuencia 2A de PTV-1 (porcine teschovirus-1), para posteriormente incluir los genes reporteros (NanoLuc luciferasa o proteínas fluorescentes). La estrategia de expresar genes reporteros desde un genoma viral mediante la secuencia 2A de PTV-1 (u otros picornavirus) ha sido ampliamente utilizada para otros sistemas virales por nosotros y otros investigadores.

Los segmentos del virus son clonados en un plásmido ambisentido como pHW, el cual contiene un promotor y terminador de la polimerasa I para que se genere el segmento viral en las células transfectadas y un promotor de la polimerasa II y secuencia de poliadenilación para generar las proteínas virales en las células. Este sistema lleva establecido en el campo desde hace más de 20 años.

Referencias:

1: Chiem K, Nogales A, Martinez-Sobrido L. Generation, Characterization, and Applications of Influenza A Reporter Viruses. *Methods Mol Biol.* 2022;2524:249-268. doi: 10.1007/978-1-0716-2453-1_19. PMID: 35821477.



2: Nogales A, Schotsaert M, Rathnasinghe R, DeDiego ML, García-Sastre A, Martínez-Sobrido L. Replication-Competent Δ NS1 Influenza A Viruses Expressing Reporter Genes. *Viruses*. 2021 Apr 17;13(4):698. doi: 10.3390/v13040698. PMID:33920517.

3: Park JG, Ávila-Pérez G, Nogales A, Blanco-Lobo P, de la Torre JC, Martínez-Sobrido L. Identification and Characterization of Novel Compounds with Broad-Spectrum Antiviral Activity against Influenza A and B Viruses. *J Virol*. 2020 Mar 17;94(7):e02149-19. doi: 10.1128/JVI.02149-19. PMID: 31941776.

4: Chiem K, Rangel-Moreno J, Nogales A, Martínez-Sobrido L. A Luciferase-fluorescent Reporter Influenza Virus for Live Imaging and Quantification of Viral Infection. *J Vis Exp*. 2019 Aug 14;(150). doi: 10.3791/59890. PMID:31475986.

5: Nogales A, Ávila-Pérez G, Rangel-Moreno J, Chiem K, DeDiego ML, Martínez-Sobrido L. A Novel Fluorescent and Bioluminescent Bireporter Influenza A Virus To Evaluate Viral Infections. *J Virol*. 2019 May 1;93(10):e00032-19. doi: 10.1128/JVI.00032-19. PMID: 30867298.

6: DiPiazza A, Nogales A, Poulton N, Wilson PC, Martínez-Sobrido L, Sant AJ. Pandemic 2009 H1N1 Influenza Venus reporter virus reveals broad diversity of MHC class II-positive antigen-bearing cells following infection in vivo. *Sci Rep*. 2017 Sep 7;7(1):10857. doi: 10.1038/s41598-017-11313-x. PMID: 28883436.

7: Breen M, Nogales A, Baker SF, Martínez-Sobrido L. Replication-Competent Influenza A Viruses Expressing Reporter Genes. *Viruses*. 2016 Jun 23;8(7):179. doi: 10.3390/v8070179. PMID: 27347991.

8: Breen M, Nogales A, Baker SF, Perez DR, Martínez-Sobrido L. Replication-Competent Influenza A and B Viruses Expressing a Fluorescent Dynamic Timer Protein for In Vitro and In Vivo Studies. *PLoS One*. 2016 Jan 25;11(1):e0147723. doi:10.1371/journal.pone.0147723. PMID: 26809059.

9: Nogales A, Rodríguez-Sánchez I, Monte K, Lenschow DJ, Perez DR, Martínez-Sobrido L. Replication-competent fluorescent-expressing influenza B virus. *Virus Res*. 2016 Feb 2;213:69-81. doi: 10.1016/j.virusres.2015.11.014. Epub 2015 Nov 15. PMID: 26590325.

g. Método de obtención:

- Extracción
- PCR x
- Síntesis *in vitro* x

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

Los distintos segmentos/genes del genoma de gripe: Dichos segmentos/genes codifican para las diferentes proteínas virales y tienen las mismas funciones.

Proteínas bioluminiscentes: Si bien las funciones de la bioluminiscencia no se conocen para todos los animales que producen este tipo de reacción exoenergética, generalmente la bioluminiscencia se usa para advertir o evadir a los depredadores, para atraer o detectar presas y para la comunicación entre miembros de la misma especie.



Secuencia 2A de PTV-1: Es un péptido de 19 aminoácidos de longitud, que puede inducir un salto ribosómico durante la traducción de una proteína en una célula. La secuencia 2A es empleada por los picornavirus para producir diferentes proteínas/péptidos a partir de un mismo marco de lectura. Además este tipo de secuencias ha sido ampliamente usadas para generar virus que expresan genes reporteros u otro tipo de construcciones, incluso en la generación de ratones transgénicos.

Influenza A virus proteins and their functions

Segment N ^o	Segment length	3'/5' Ψ	Primary transcript		Secondary transcript	
			Protein	Function	Protein	Function
1	2,341	30/120	PB2	Component of viral polymerase complex. Host cell capped mRNA recognition and binding.		
2	2,341	60/120	PB1	Component of viral polymerase complex. RNA-dependent RNA polymerase. Endonuclease activity.	PB1-F2	Induces cell death.
3	2,233	12/21	PA	Component of viral polymerase complex. Involved in cap-snatching.	PA-X	Repression of cellular host gene expression.
4	1,775	45/80	HA	Glycosylated surface protein. Binding to cellular receptor. Major antigenic determinant.		
5	1,565	60/120	NP	Nucleoprotein. Encapsidation of the RNA segments to form the viral Ribonucleoprotein complexes.		
6	1,409	183/157	NA	Glycosylated surface protein. Neuraminidase activity to release newly made virus from infected cells.		
7	1,027	222/220	M1	Matrix protein 1. Mediate viral encapsidation. Involved in export of vRNPs from the nucleus.	M2	Matrix protein 2. Ion channel.
8	890	35/35	NS1	Non-structural protein 1. Inhibits the host interferon response.	NEP	Mediates nuclear export of vRNPs.

[Open in a separate window](#)

N^o, influenza virus segment number

Ψ, packaging signals: numbers represent nucleotide positions in the negative sense (obtained from www.fludb.org).

Development and applications of single-cycle infectious influenza A virus (sciIAV). Nogales A, Baker SF, Domm W, Martínez-Sobrido L. Virus Res. 2016 May 2;216:26-40. doi: 10.1016/j.virusres.2015.07.013. Epub 2015 Jul 26. PMID: 26220478

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

El genoma de gripe está compuesto por 8 segmentos virales. En ocasiones cuando una misma célula se infecta con dos o más tipos de IAV o IBV, pueden surgir virus que contengan una composición genética distinta a los virus originales. Esta reorganización de segmentos, es común en virus con genomas segmentados. No obstante, en este caso los genes del organismo donante serán sintetizados de novo y clonados en plásmidos. Posteriormente, se rescataran los virus deseados empleando técnicas de genética reversa, como ya indicado anteriormente. No se han planeado experimentos de coinfección, por tanto el intercambio de material genético es altamente



improbable o imposible. Además no se usará virus vivo para obtener los genes de gripe, por tanto no se trabajará con el organismo donante.



IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

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

En este proyecto, construiremos virus recombinantes de IAV o IBV que expresen o no la proteína NanoLuc (Luciferasa) o proteínas fluorescentes comunes (Venus, GFP, mCherry). Estos virus serán utilizados para estudiar las infecciones virales, la evaluación de vacunas, o la identificación/desarrollo de compuestos con actividad antiviral. Se generaran virus recombinantes similares o iguales a los que circulan entre humanos o en la naturaleza (y su versión atenuada expresando un gen reportero).

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:

Los genes de IAV o IBV serán sintetizados de novo y clonados en plásmidos ambisentido. El segmento 8 recombinante conteniendo la secuencia 2A para insertar el gen NanoLuc o proteínas fluorescentes también están clonados en plásmidos. Posteriormente los genes reporteros serán amplificados por PCR y clonados en el segmento 8 modificado que contiene la secuencia 2A de PTV-1. Tanto el plásmido ambisentido como plásmidos comerciales con genes reporteros, se encuentran en el laboratorio o se obtendrán de colaboradores. El virus recombinantes (con o sin gen reportero) se recupera por transfección de células con los 8 plásmidos que codifican cada uno de los genes/segmentos de IAV/IBV. En el caso del segmento 8, se usarán distintas alternativas utilizando plásmidos que contengan el segmento original o las versión modificadas para expresar el gen reportero.

Referencias:

1: Martínez-Sobrido L, DeDiego ML, Nogales A. Reverse genetics approaches for the development of new vaccines against influenza A virus infections. *Curr Opin Virol.* 2020 Oct;44:26-34. doi:10.1016/j.coviro.2020.06.001. Epub 2020 Jun 27. PMID: 32599532.

2: Nogales A, Perez DR, Santos J, Finch C, Martínez-Sobrido L. Reverse Genetics of Influenza B Viruses. *Methods Mol Biol.* 2017;1602:205-238. doi:10.1007/978-1-4939-6964-7_14. PMID: 28508223.

3: Nogales A, Martínez-Sobrido L. Reverse Genetics Approaches for the Development of Influenza Vaccines. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 22;18(1):20. doi:10.3390/ijms18010020. PMID: 28025504.

4: Breen M, Nogales A, Baker SF, Martínez-Sobrido L. Replication-Competent Influenza A Viruses Expressing Reporter Genes. *Viruses.* 2016 Jun 23;8(7):179. doi:10.3390/v8070179. PMID: 27347991.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

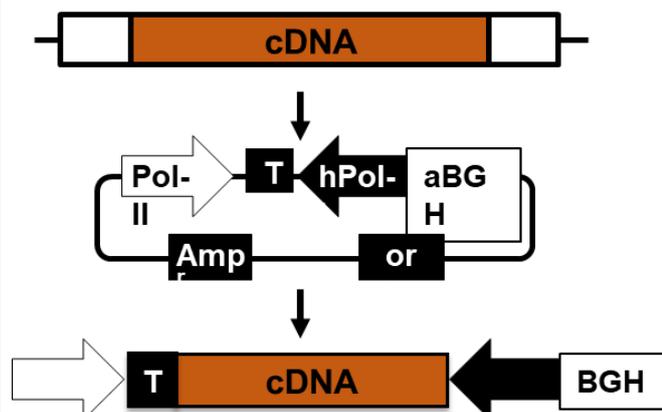
a. Tipo e identidad del vector (plásmido, virus, otros):

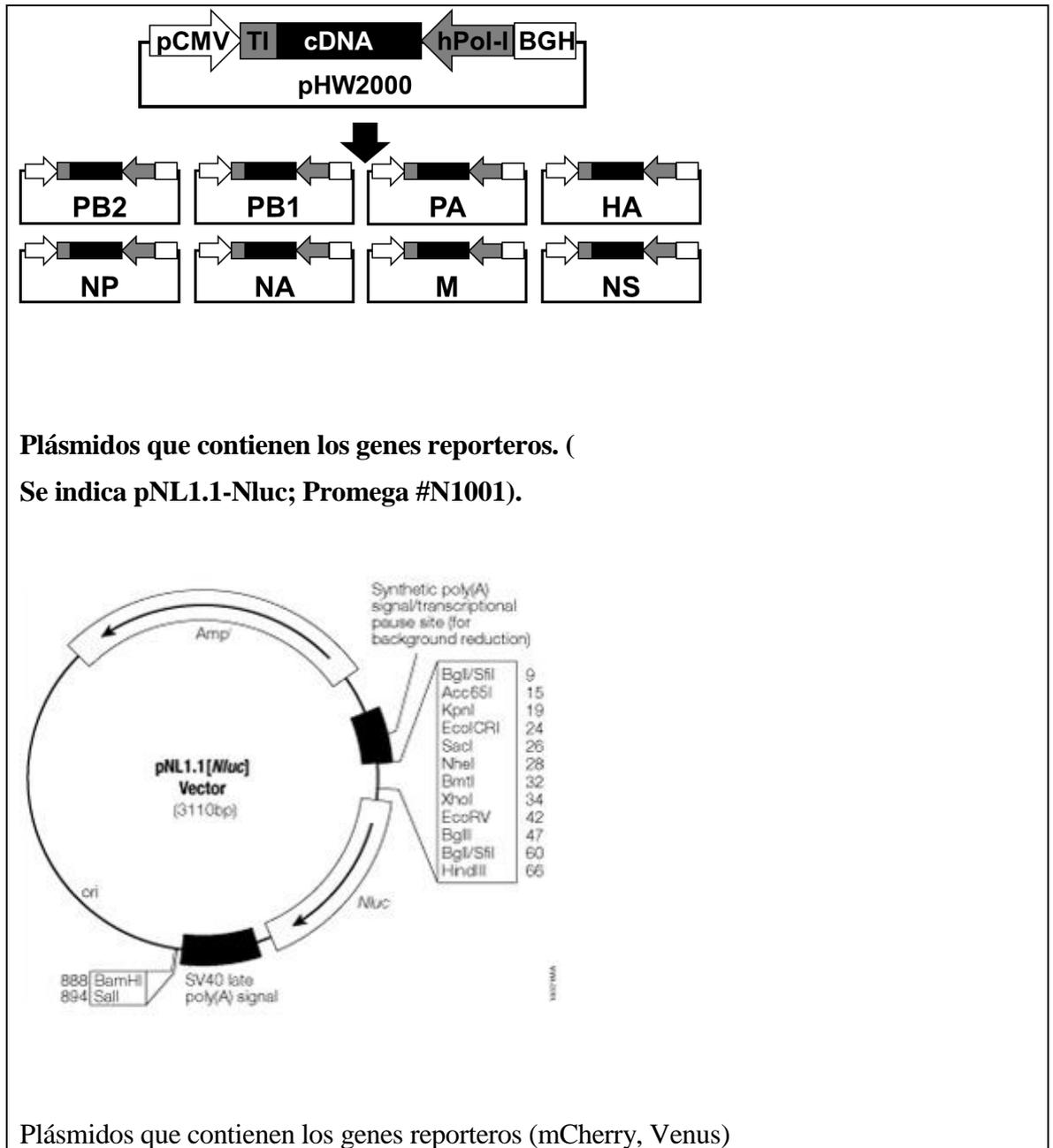
Plásmido.

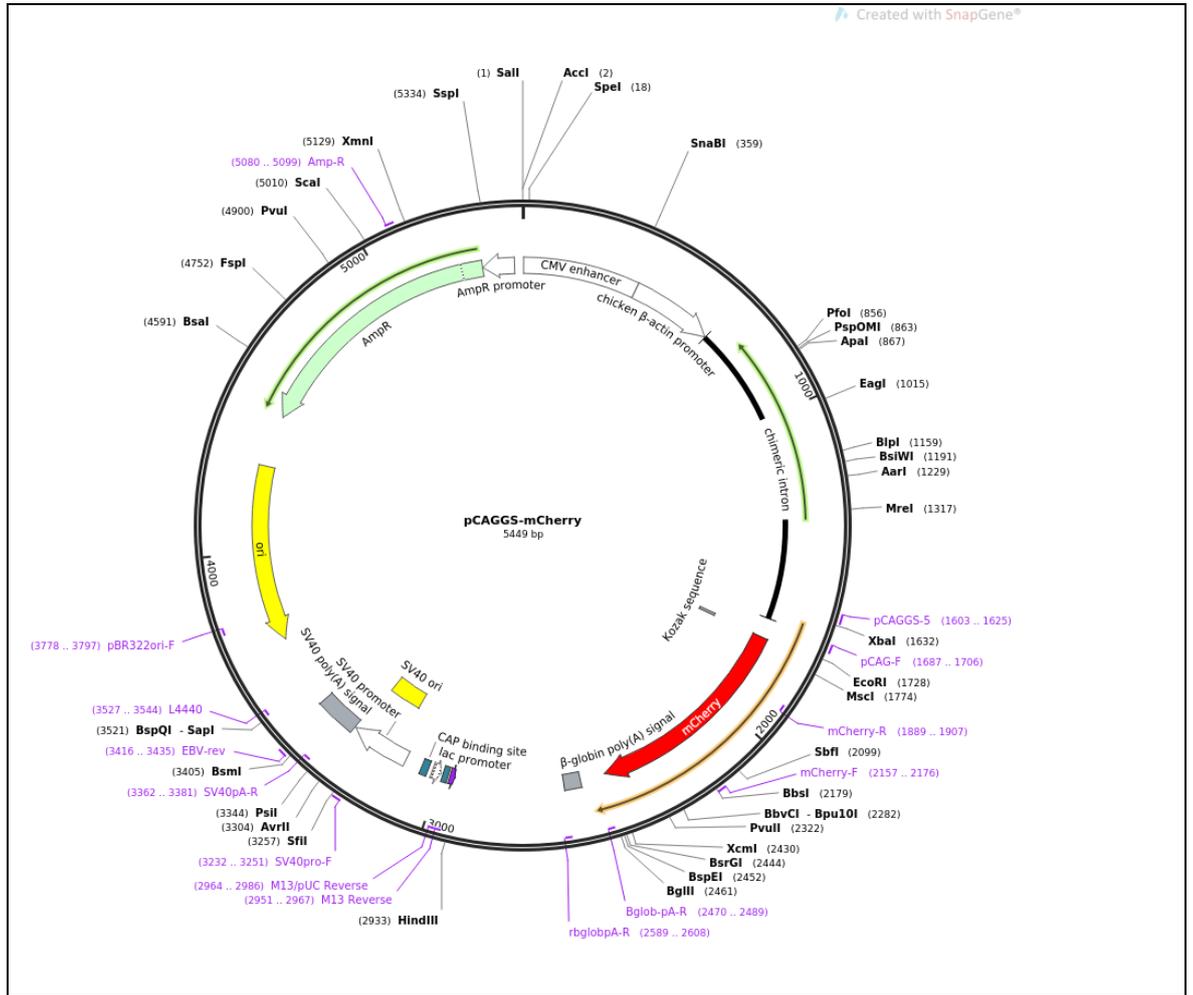
i) Aportar mapa de restricción del vector. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación y cualquier otro elemento presente en el vector.

Los vectores utilizados para insertar los genes sintéticos no producen ninguna propiedad nociva. Además, los virus recombinantes generados por genética reversa no incorporan ninguna secuencia del vector utilizado.

Plásmido ambisentido pHW: el cDNA (cada gen/segmento viral) es clonado en este plásmido. Contiene un promotor y terminador de la polimerasa I para generar los segmentos virales en el interior de la célula transfectada y un promotor de la polimerasa II y secuencia de poliadenilación para generar los mRNAs y proteínas virales. Este tipo de plásmidos se llevan usando más de 20 años en la genética reversa de IAV.









NO. 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 virus, y solo se utilizan para la propagación del plásmido en cultivos de bacterias.

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

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

En esta tabla se indica la función de cada proteína de gripe

Influenza A virus proteins and their functions

Segment		Primary transcript			Secondary transcript	
Nº	Segment length	3'/5' ψ	Protein	Function	Protein	Function
1	2,341	30/120	PB2	Component of viral polymerase complex. Host cell capped mRNA recognition and binding.		
2	2,341	60/120	PB1	Component of viral polymerase complex. RNA-dependent RNA polymerase. Endonuclease activity.	PB1-F2	Induces cell death.
3	2,233	12/21	PA	Component of viral polymerase complex. Involved in cap-snatching.	PA-X	Repression of cellular host gene expression.
4	1,775	45/80	HA	Glycosylated surface protein. Binding to cellular receptor. Major antigenic determinant.		
5	1,565	60/120	NP	Nucleoprotein. Encapsidation of the RNA segments to form the viral Ribonucleoprotein complexes.		
6	1,409	183/157	NA	Glycosylated surface protein. Neuraminidase activity to release newly made virus from infected cells.		
7	1,027	222/220	M1	Matrix protein 1. Mediate viral encapsidation. Involved in export of vRNPs from the nucleus.	M2	Matrix protein 2. Ion channel.
8	890	35/35	NS1	Non-structural protein 1. Inhibits the host interferon response.	NEP	Mediates nuclear export of vRNPs.

[Open in a separate window](#)

Nº, influenza virus segment number
 ψ, packaging signals; numbers represent nucleotide positions in the negative sense (obtained from www.fludb.org).

Development and applications of single-cycle infectious influenza A virus (sciIAV). Nogales A, Baker SF, Domm W, Martínez-Sobrido L. Virus Res. 2016 May 2;216:26-40. doi: 10.1016/j.virusres.2015.07.013. Epub 2015 Jul 26. PMID: 26220478

Los distintos segmentos/genes del genoma de gripe: Dichos segmentos/genes codifican para las diferentes proteínas virales de IAV y tienen las mismas funciones. En el caso de la Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA), la principal función es la entrada y salida de la célula.

Los virus recombinantes que serán generados (con o sin genes reporteros) han sido seleccionados atendiendo a varios criterios: 1) virus que circulan actualmente o han circulado recientemente; 2) recomendaciones de la OMS como cepas para generar vacunas frente a gripe



(tanto para gripe estacional como aviar, [Global Influenza Programme \(who.int\) https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/vaccines/who-recommendations/zoonotic-influenza-viruses-and-candidate-vaccine-viruses](https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/vaccines/who-recommendations/zoonotic-influenza-viruses-and-candidate-vaccine-viruses)); 3) Virus ya rescatados y generados por otros laboratorios y que por tanto sabemos que crecen bien en cultivos celulares así como la viabilidad de ser rescatados mediante técnicas de genética reversa. 4) Disponibilidad de secuencias fiables depositadas en las bases de datos y/o obtenidas de colaboradores.

Los virus seleccionados y sus secuencias de referencia son incluidos.

Gripe estacional

-A/H1N1: A/California/04/2009 (GISAID: EPI_ISL_393964)

-A/H3N2: A/Wyoming/3/2003 (NCBI:txid480024)

-B/Victoria: B/Brisbane/60/2008 (NCBI:txid604436)

Gripe aviar:

-H5N1: A/VietNam/1203/2004, A/chicken/Egypt/F71-F114C/2022, A/American wigeon/South Carolina/22-000345-001/2021, A/mink/Spain/22VIR12774-14_3869-3/2022 (GISAID: EPI_ISL_10656749, EPI_ISL_17239064, EPI_ISL_18133029, EPI_ISL_16507096)

-H7N9: A/Anhui/1/2013 (GISAID: EPI_ISL_138739)

-H3N2: A/chicken/Ganzhou/GZ157/2016 (GISAID: EPI_ISL_252830)

-H9N2: A/Oman/2747/2019, A/Anhui-Lujiang/39/2018, A/turkey/Wisconsin/1/1966, A/quail/Hong Kong/G1/1997. H9N2 (GISAID: EPI_ISL_353983, EPI_ISL_330737, EPI_ISL_70131, EPI_ISL_260531)

Proteínas bioluminiscentes/fluorescentes: Si bien las funciones de la bioluminiscencia/fluorescencia no se conocen para todos los animales que producen este tipo de reacción exoenergética, generalmente la bioluminiscencia/fluorescencia se usa para advertir o evadir a los depredadores, para atraer o detectar presas y para la comunicación entre miembros de la misma especie.

Secuencia 2A de PTV-1: Es un péptido de 19 aminoácidos de longitud, que puede inducir un salto ribosómico durante la traducción de una proteína en una célula. La secuencia 2A es empleada por los picornavirus para producir diferentes proteínas/péptidos a partir de un mismo marco de lectura. Además este tipo de secuencias ha sido ampliamente usadas para generar virus que expresan genes reporteros u otro tipo de construcciones, incluso en la generación de ratones transgénicos.

b. Información sobre los genes estructurales:

Los genes estructurales de gripe son: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M1, M2.

c. Información sobre los elementos reguladores:

-La expresión de los genes de gripe viene regulada por secuencias no codificantes a ambos extremos de cada gen.



-Secuencia 2A de PTV-1: Es un péptido de 19 aminoácidos de longitud, que puede inducir un salto ribosómico durante la traducción de una proteína en una célula. La secuencia 2A es empleada por los picornavirus para producir diferentes proteínas/péptidos a partir de un mismo marco de lectura. Además este tipo de secuencias ha sido ampliamente usadas para generar virus que expresan genes reporteros u otro tipo de construcciones, incluso en la generación de ratones transgénicos.

No aplica.

d. ¿Ha sido secuenciada?

Todos los genes de gripe serán sintetizados de novo. Si en algún caso son amplificados por PCR, los plásmidos finales serán secuenciados. Asimismo, se confirmará por secuenciación que los genes reporteros no tienen mutaciones.

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

No aplica.

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

No aplica.

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:

No aplica

o Secuencias colindantes:

No aplica

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

No aplica

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

o Localización cromosómica:

No aplica

o Secuencias colindantes:

No aplica

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

No aplica

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

No aplica

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

i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación) x

ii) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA) x

iii) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas) x



V. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG)

1. Descripción del OMG final

OMGs: Nuevos virus recombinantes de IAV/IBV serán generados mediante técnicas de genética reversa, ya establecidas en el campo. Algunos de los virus recombinantes también expresarán un gen reportero para seguir la infección de células.

Las técnicas de genética reversa, son detalladas en las correspondientes secciones (ver también las referencias aportadas) y se basan en metodologías ya descritas y establecidas en el campo. Estas técnicas se han utilizado para el rescate de virus recombinantes que permitan el estudio de las infecciones por IAV/IBV, la generación de vacunas, etc.

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

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

NO

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

NO

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

NO. No obstante, los virus que expresan un gen reportero están atenuados.

- 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:

Los genes reporteros y la secuencia 2A, también servirán como marcadores específicos.

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

Se espera que el OMG tenga la misma estabilidad genética que los virus de IAV/IBV aislados en la naturaleza. Nosotros y otros hemos observado que en algunos casos los genes reporteros pueden verse afectados (delecciones, introducción de codones de parada, etc..) si los virus son pasados múltiples veces en cultivos celulares..

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



El genoma de gripe está compuesto por 8 segmentos virales. En ocasiones cuando una misma célula se infecta con dos o más tipos de IAV o IBV, pueden surgir virus que contengan una composición genética distinta a los virus originales. Esta reorganización de segmentos, es común en virus con genomas segmentados. No obstante, la actividad se va a llevar a cabo en un laboratorio del CISA-INIA-CSIC, instalación con nivel de bioseguridad tipo 3. El OMG estará confinado a este espacio y no saldrá del mismo. Además no se han planeado experimentos de co-infección. Por tanto la posibilidad de intercambio de material genético entre dos virus es muy baja o nula.

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

PCR, secuenciación, western blot, técnicas de biología molecular, análisis de expresión de proteínas virales y del gen reportero, ensayos de neutralización, etc.

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).

1-Estudio de la dinámica de infección de los virus generados en cultivos celulares mediante infecciones con distintas multiplicidades de infección. Se usarán distintas líneas celulares ya establecidas. Los niveles de expresión de proteínas serán evaluados mediante inmunofluorescencia o western blot utilizando anticuerpos específicos comerciales o sueros policlonales. Además, en el caso de los virus que expresen un gen reportero, también se evaluará la expresión del mismo.

2-Identificación de factores celulares implicados en la infección, por ejemplo realizando ensayos de inmunoprecipitación, proteómica, etc.

3-Identificación y evaluación de anticuerpos y compuestos con actividad antiviral. Para ello usaremos ensayos de microneutralización, ensayos de inhibición, Ensayos de reducción de placa, etc. Para esta actividad los virus reporteros serán de gran utilidad, ya que podrán desarrollarse ensayos de microneutralización basados en la expresión del gen reportero.

4-Análisis de vacunas y de la dinámica de infección en un modelo de ratón. La presencia del virus será analizada en distintos órganos como pulmones y mucosa nasal. No obstante, estos experimentos quedan condicionados a obtener financiación específica para este tipo de ensayos (proyecto en evaluación) y la aprobación de un protocolo para llevar a cabo los experimentos *in vivo*. Los virus recombinantes (10^2 - 10^5 ufp) serán inoculados en los animales vía intranasal. Previamente los animales serán anestesiados con isoflurano o una mezcla de ketamina/xilazina.

En todos los casos estamos muy familiarizados con este tipo de ensayos así como en la generación y caracterización de virus recombinantes de gripe utilizando técnicas de genética reversa.

Todos los ensayos se beneficiarán de tener virus recombinantes que expresen un gen reportero, dado que la expresión del mismo correlaciona con la replicación viral. La cuantificación del gen reportero puede contribuir a avanzar más rápido en la investigación, reducir el número de células o animales infectados, etc

Todos los ensayos se realizarán en la instalación de tipo 3 del CISA-INIA-CSIC (notificación A/ES/00/I-01), del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC) autorizada con anterioridad por el Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente (CIOMG) mediante resolución con fecha 04/12/2001.

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

30 mL con un título viral aproximado de 10^6 unidades formadoras de placa (PFU)/ ml.

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

In vitro: Infección de células a distintas multiplicidades de infección (0.001 a 1)

In vivo: Inoculación intranasal de 100-10000 Unidades formadoras de placa (UFP)



b. Número aproximado de plantas por ensayo:

No aplica

c. Número aproximado de animales por ensayo:

25

3. Naturaleza de las operaciones:

- a. Enseñanza
- b. Investigación x
- 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).

5 años si se sigue obteniendo la financiación necesaria.

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.

Virus de la gripe. Influenza A and B virus (IAV y IBV, respectivamente).

Generación de virus recombinantes de IAV o IBV mediante técnicas de genética reversa (ya explicadas). Como ya se ha indicado, el OMG y el organismo receptor son en esencia lo mismo puesto que los virus recombinantes serán generados de novo utilizando técnicas de genética reversa y genes sintetizados por una empresa. **Las propiedades nocivas del organismo receptor, son las mismas que las del virus aislado en la naturaleza. Ya se ha indicado anteriormente la relevancia de IAV/IBV en salud animal y humana. En el caso de virus recombinantes que codifican genes reporteros, nuestra experiencia es que estarán más atenuados.**

El virus de gripe A y B estacional se consideran grupo de riesgo 2. Los virus de gripe aviar se consideran de grupo de riesgo 3. Existen vacunas para la gripe estacional de uso común. En el caso de gripe aviar, también hay vacunas aprobadas para su uso en caso de necesidad.

La infección por gripe produce enfermedad respiratoria o gastrointestinal de mayor o menor gravedad dependiendo del subtipo de virus, la especie infectada, y el estado de salud del sujeto infectado. La infección también puede ser asintomática. El virus de la gripe causa



una infección contagiosa que se caracteriza por la aparición de fiebre, pudiendo ir acompañada de escalofríos, sudoración, cefaleas, dolores musculares, astenia, anorexia, conjuntivitis y/o síntomas respiratorios (congestión nasal, dolor de garganta, tos seca). Pueden producirse complicaciones respiratorias (neumonía, bronquitis, sobreinfecciones bacterianas broncopulmonares, sinusitis), y menos frecuentemente cardiovasculares o neurológicas. También puede producirse deshidratación y empeoramiento de condiciones médicas crónicas preexistentes, como asma, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), fibrosis quística, o diabetes. La mayor parte de la población tiene algo de protección frente a la gripe estacional por haber recibido la vacuna o infecciones anteriores.

En el caso de los genes reporteros no se ha descrito un papel en patogénesis y serán obtenidos mediante PCR utilizando como molde un plásmido comercial. PTV-1, del que solo se usará una secuencia de 19 aminoácidos, es un virus que afecta principalmente a cerdos. La infección por PTV puede ser subclínica o causar encefalomielitis y enfermedad grave o leve. La PTV se ha asociado en algunos casos con diarrea, neumonía, pericarditis y miocarditis. No se ha descrito que la secuencia 2A utilizada sea un factor de virulencia por si solo o fuera del contexto de PTV-1.

b. Organismo donante.

Genes de IAV o IBV (sintetizados *de novo* por una empresa del sector) y genes reporteros (obtenidos por PCR de un plásmido) como NanoLuc luciferasa o proteínas fluorescentes típicas (GFP, Venus, mCherry). **Por tanto puede considerarse que no se utilizará directamente el organismo donante.**

Las propiedades nocivas del organismo IAV/IBV, son las mismas que las del virus aislado en la naturaleza o el organismo receptor y OMG. Ya se ha indicado anteriormente la relevancia de IAV/IBV en salud animal y humana. En el caso de virus recombinantes que codifican genes reporteros, nuestra experiencia es que estarán más atenuados.

No se ha descrito ninguna propiedad nociva o tóxica en los genes reporteros que serán utilizados. Los organismos de los que provienen utilizan este tipo de proteínas para cazar o huir de depredadores, etc. No existen propiedades tóxicas o nocivas

c. Inserto.

Genes sintéticos de gripe y genes reporteros como proteínas fluorescentes (Venus, mCherry) o luciferasas (como NanoLuc).

Las propiedades nocivas del organismo IAV/IBV, son las mismas que las del virus aislado en la naturaleza. Ya se ha indicado anteriormente la relevancia de IAV/IBV en salud animal y humana. En el caso de virus recombinantes que codifican genes reporteros, nuestra experiencia es que estarán más atenuados. La función de los distintos genes virales ya ha sido descrita.

No se ha descrito ninguna propiedad nociva o tóxica en los genes reporteros que serán utilizados. Los organismos de los que provienen utilizan este tipo de proteínas para cazar o huir de depredadores, etc. No existen propiedades tóxicas o nocivas.



Secuencia 2A de PTV-1: Es un péptido de 19 aminoácidos de longitud, que puede inducir un salto ribosómico durante la traducción de una proteína en una célula. La secuencia 2A es empleada por los picornavirus para producir diferentes proteínas/péptidos a partir de un mismo marco de lectura. Además este tipo de secuencias ha sido ampliamente usadas para generar virus que expresan genes reporteros u otro tipo de construcciones, incluso en la generación de ratones transgénicos. **No se ha descrito ninguna propiedad nociva o tóxica en esta secuencia.**

d. Vector.

-Plásmido ambisentido pHW: el cDNA (cada gen/segmento viral) es clonado en este plásmido. Contiene un promotor y terminador de la polimerasa I para generar los segmentos virales en el interior de la célula transfectada y un promotor de la polimerasa II y secuencia de poliadenilación para generar los mRNAs y proteínas virales. Este tipo de plásmidos se llevan usando más de 20 años en la genética reversa de IAV. Los genes de gripe son clonados en plásmidos para el rescate en células. Las secuencias del vector no se inserta en el virus o la célula. El vector no tiene ninguna propiedad que se pueda considerar nociva.

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

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

Las propiedades nocivas del OMGs son las mismas que el aislado natural. En el caso de los virus que expresen genes reporteros, estos estarán atenuados.

-Los genes de IAV/IBV sintetizados tienen las mismas funciones que los genes originales. Por tanto, los virus recombinantes tendrán propiedades similares a los aislados naturales de IAV.

El virus de gripe A y B estacional se consideran grupo de riesgo 2. Los virus de gripe aviar se consideran de grupo de riesgo 3. El virus inactivado no se considera patogénico.

IAV infecta diversas especies de mamíferos (incluyendo humanos) y aves. Mientras IBV infecta casi exclusivamente humanos.

La infección por IAV/IBV o gripe produce enfermedad respiratoria o gastrointestinal de mayor o menor gravedad dependiendo del subtipo de virus, la especie infectada, y el estado de salud del sujeto infectado. La infección también puede ser asintomática. IAV/IBV causa una infección contagiosa que se caracteriza por la aparición de fiebre, pudiendo ir acompañada de escalofríos, sudoración, cefaleas, dolores musculares, astenia, anorexia, conjuntivitis y/o síntomas respiratorios (congestión nasal, dolor de garganta, tos seca). Pueden producirse complicaciones respiratorias (neumonía, bronquitis, sobreinfecciones bacterianas broncopulmonares, sinusitis), y menos frecuentemente cardiovasculares o neurológicas. También puede producirse deshidratación y empeoramiento de condiciones médicas crónicas preexistentes, como asma, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), fibrosis quística, o diabetes. La mayor parte de la población tiene algo de protección frente a la gripe estacional por haber recibido la vacuna o infecciones anteriores.

No se han descrito los genes que codifican para proteínas fluorescentes o bioluminiscentes, o la secuencia 2A de PTV-1 por sí sola, como factores de virulencia de ningún virus o agente biológico. -En el caso de los genes reporteros no se ha descrito un papel en patogénesis.

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



--

b. Efectos para el medio ambiente.

Los OMGs generados [virus recombinantes de IAV/IBV con o sin genes reporteros] no producen efectos distintos para el medio ambiente, que los que puedan producir los aislados naturales de IAV.

Las actividades indicadas para las que los OMG serán utilizados se llevarán a cabo en un centro de investigación con altos niveles de bioseguridad y los OMG no serán liberados al medio ambiente. Asimismo, se trabajará con cantidades reducidas del OMG adoptando las medidas de bioseguridad apropiadas (descritas en las correspondientes secciones)

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

Las fases más críticas en relación a la bioseguridad son la generación de los stocks de trabajo, puesto que es el momento donde se maneja mayor cantidad de virus. Una vez obtenidos los OMGs mediante genética reversa se amplifican en células de mamíferos MDCK. El virus obtenido del sobrenadante celular será centrifugado y almacenado a -80°C en alícuotas de trabajo perfectamente etiquetadas.

Los stocks virales serán utilizados para el resto de actividades indicadas. Aunque la cantidad de virus que se maneja en dichas actividades es mucho menor, las medidas de contención y bioseguridad que se aplican son las mismas.

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

La actividad se va a llevar a cabo en un laboratorio del CISA-INIA-CSIC, instalación con nivel de bioseguridad tipo 3. El OMG estará confinado a este espacio y no saldrá del mismo. El riesgo de contaminación indoor out door es prácticamente inexistente. El nivel de biocontención aplicado excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.

El servicio de Bioseguridad verifica, vigila y comprueba periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

Se dispone de procedimientos escritos de bioseguridad para cualquier tipo de operación donde se especifican las normas de bioseguridad, equipos de protección individual necesarios, limpiezas y biodescontaminaciones, cualificaciones y validaciones físicas y microbiológicas, traslado de muestras, envíos y paquetería, accesos de personas, animales y objetos independientes, establecimiento de cuarentenas y gestión de residuos, entre otros

Se imparten curso específico para animalario teórico y práctico antes de iniciar la actividad. Se realizan seminarios periódicos.

La instalación completa dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.



Las infecciones se realizan siempre en cabinas de seguridad biológica (con filtros HEPA) presentes en el laboratorio NCB3. Los cultivos celulares infectados se incuban en un incubador a 37°C. Las infecciones se realizan siguiendo protocolos de infección previamente descritos y bien establecidos en el laboratorio y el campo. Todos los procesos de manipulación se llevarán a cabo en cabina de bioseguridad. Los residuos biosanitarios líquidos se inactivarán con Virkon o PeraSafe. Los residuos biosanitarios sólidos serán posteriormente autoclavados y retirados por una empresa autorizada.

La zona de contención biológica de 10.824 m², posee unas características arquitectónicas y funcionales reconocidas internacionalmente para la consecución de la bioseguridad. La característica principal del laboratorio es proporcionar un grado de estanqueidad total para evitar la liberación el medio externo de cualquier agente patógeno sobre el que se esté llevando a cabo alguna línea de investigación. Para llevar a cabo unas correctas medidas de seguridad, el Centro está diseñado siguiendo unos 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 de puertas con cerradura de seguridad y ajuste neumático. El Centro presenta un modelo 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 todo el sistema de filtración de Alta Eficacia del aire y la planta inferior está habilitada para los procesos de gestión de residuos sólidos y efluentes y para la entrada y salida de animales y material 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 por triplicado.

Dentro de las características funcionales, se encuentran:

- El tratamiento del aire y ventilación estando Las condiciones termo-higrométricas se encuentran reguladas en todo momento. La humedad relativa se mantiene a niveles reducidos (35%) para así evitar que agentes biológicos aerotransportables queden fijados en codos y rugosidades del sistema de circulación del aire.
- Existe establecido en toda la zona Biocontenida, un mantenimiento de la presión negativa respecto a la atmosférica en gradiente diferencial unidireccional de flujo continuo en laboratorios y en cascada en boxes de experimentación de pasos de ente 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, en ningún momento se recircula aire.
- El aire de salida es filtrado mediante un sistema simple o doble seriado de filtros HEPA H14 (High efficiency Particulate Air) que consta de 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 con 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 m³ controlando temperatura, presión y pH.

La temperatura se eleva por encima de 136°C 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.

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.

- Control 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 dentro 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 incluyen la obligación de descontaminación por arrastre y dilución gracias a la toma una ducha automática de agua de 3 minutos de duración. Bajo ningún concepto es posible extraer cualquier objeto de dentro 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 cumplimiento de las normas y cuarentenas establecidas (se adjunta formato), destacando:

- 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, materia o superficies contaminados 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 la situación 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 Contención, 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 entendiéndose estas 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 en el Centro.

Estas cuarentenas varían entre los 3 y 5 días mínimo.

De igual manera que con los equipos de protección individual, el trabajador deja constancia documental de cumplimiento de esta circunstancia.

El box de experimentación animal donde se realizan las actividades con distintos OMGs y agentes infecciosos, además de las medidas reflejadas, ofrece:

- Inactivación de residuos en CSB mediante procedimientos normalizados.
- Inactivación 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 10⁶
- Equipo de técnicos especializados 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:

Las normas básicas de bioseguridad a seguir son las recogidas en el Manual de Bioseguridad para trabajos con virus de la Influenza A/B (IAV, IBV) y Manual de Procedimientos Generales de

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.



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

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. La empresa es Veolia.

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA

1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Indicadas en Plan de Evacuación

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Reflejados en procedimientos específicos para el virus de la gripe. Cabinas de cultivos, equipos de protección individual cuando proceda, etc..

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

Manual de bioseguridad para gripe, plan de Evacuación, Procedimientos de Bioseguridad específicos para el virus de la gripe (laboratorio y animalario).

4. Planes de emergencia y contingencia:

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 frío o torres de refrigeración, etc.), bajo indicación y supervisión del Jefe de Servicio de Seguridad Biológica.