NOTIFICACIÓN SOBRE ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Responsables de la actividad

a. Entidad

Nombre: Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA, 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

Tel:

Correo electrónico: esther.esteban@inia.csic.es

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Germán Andrés Hernández

NIF: 50817764T

Cargo: Científico titular CSIC

Tel: 916202300

Correo electrónico: german.andres@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

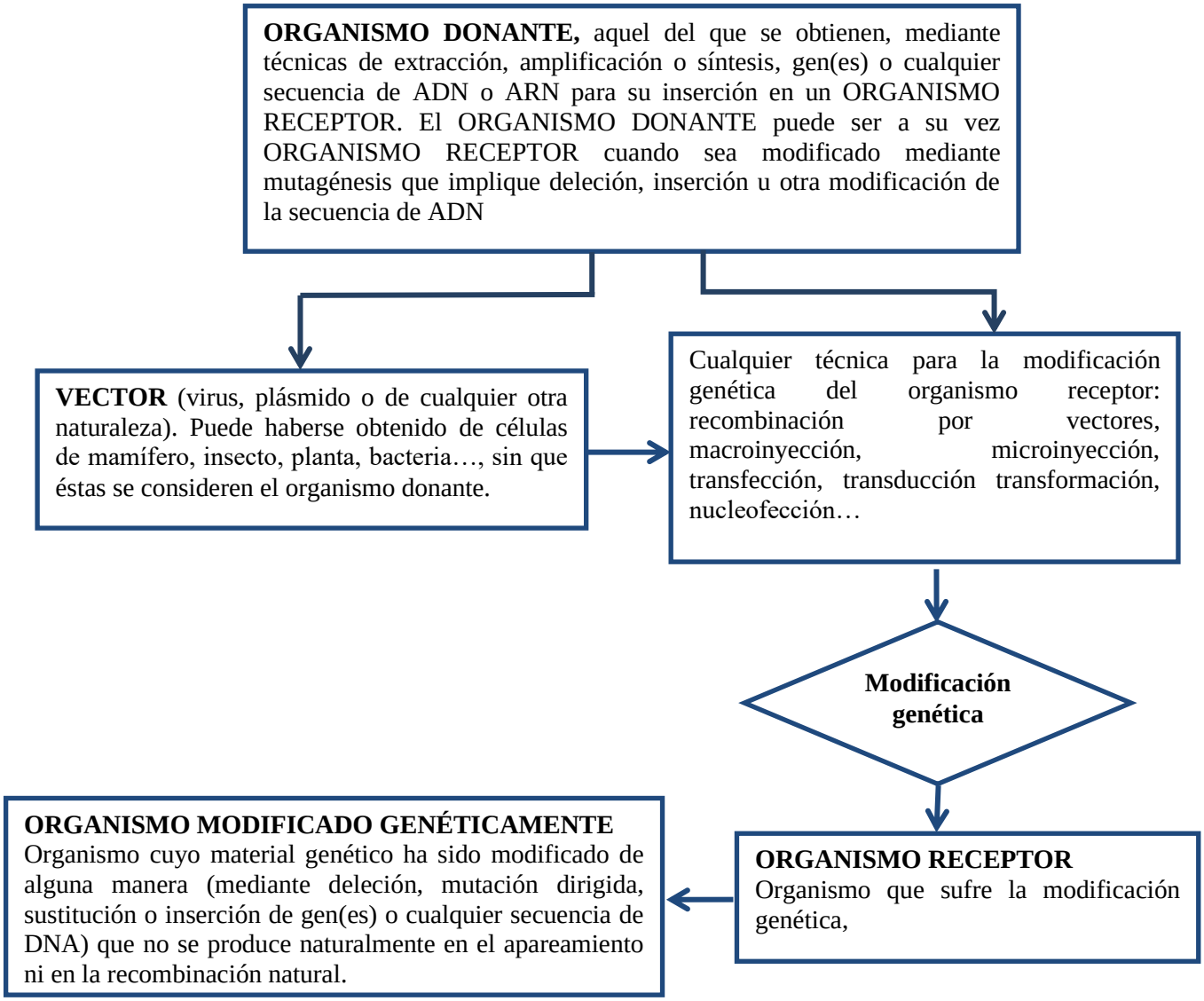
Correo electrónico: laura.perez@inia.csic.es

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

Laura Pérez Palancar

PLAZA DE SAN JUAN DE LA CRUZ, 10
28071 MADRID
TEL.: 91 597 56 50

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 especificando[1]**:**

– Nombre de la convocatoria:

Proyectos de generación de conocimiento 2021

– Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

PID2021-126791NB-I00, Germán Andrés Hernández

– Organismo financiador:

Agencia Estatal de Investigación - Ministerio de Ciencia e Innovación

Otro tipo de financiación[2] ☐

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

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

A/ES/00/I-01

– Fecha de autorización de la instalación:

04/12/2000

Si el OMG no se genera en la instalación[3]:

– 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/../..)

[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.

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

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

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

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

3. Finalidad de la actividad:

Se pretende generar una colección de virus de la peste porcina africana (VPPA) recombinantes que carezcan de genes que codifican proteínas estructurales, previamente detectadas en el proteoma del virión por nuestro grupo de investigación (Alejo A, Matamoros T, Guerra M, Andrés G. A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle. J Virol. 2018 Nov 12;92(23):e01293-18) o cuya actividad es necesaria para la formación de la partícula viral (Epifano C, Krijnse-Locker J, Salas ML, Rodríguez JM, Salas J. The African swine fever virus nonstructural protein pB602L is required for formation of the icosahedral capsid of the virus particle. J Virol. 2006 Dec;80(24):12260-70).

El fin es estudiar el papel de estas proteínas individualmente en el ciclo replicativo viral.

Los OMGs se generarán sobre el aislado viral Ba71V (avirulento y no infeccioso para el hospedador porcino y adaptado a células Vero en cultivo) y se utilizarán en estudios bioquímicos y estructurales mediante la infección de células en cultivo exclusivamente.

Se pretenden generar hasta 12 virus recombinantes distintos para eliminar individualmente los genes ....

4. Clasificación de la actividad:

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

Tipo 3 ☒

Tipo 4 ☐

[4] Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- **(ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas)** del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones.
- **Reglamento (CE) 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**. 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) 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/
- **Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances** Edición bianual de la OMS

III. INFORMACIÓN RELATIVA A LA OBTENCIÓN DEL OMG

1. Organismo receptor del cual deriva el OMG:

Células humanas/primates	☐	Detallar las líneas celulares:
Células: otras	☐	Detallar las líneas celulares:
Animal	☐	
Planta	☐	
Bacteria	☐	
Hongo	☐	
Virus	☒	
Protozoos	☐	

-Especificar el nombre científico y común:

Virus de la peste porcina africana (VPPA) Aislado Ba71V.

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

i) Técnicas de aislamiento: el laboratorio dispone de stocks del aislado Ba71V del VPPA obtenidos previamente mediante plaqueo sobre monocapas de células Vero en medio semisólido. Estos stocks se amplificarán mediante crecimiento en células Vero en cultivo siguiendo protocolos previamente establecidos en el laboratorio.

ii) Técnicas de identificación: : el aislado Ba71V de VPPA se puede identificar mediante una o varias de las siguientes técnicas complementarias: i) determinación del tamaño y morfología de la placa viral característica formada en monocapas de células Vero, ii) identificación mediante PCR o qPCR con oligonucleótidos específicos de material genético aislado directamente de las placas virales, iii) secuenciación del genoma viral completo mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (Illumina), iv) detección mediante técnicas de inmunomarcaje (western blot, inmunofluorescencia, inmunomicroscopía electrónica) con anticuerpos específicos monoclonales o policlonales y v) visualización directa de las partículas virales mediante tinción negativa con acetato de uranilo y microscopía electrónica.

iii) Marcadores genéticos: secuencia completa del genoma (NC_001659.2)

iv) Marcadores fenotípicos: hemadsorción

v) Estabilidad genética: la frecuencia de mutación del aislado Ba71V durante la infección de células Vero es menor de $4x10^{-5}$ por ciclo replicativo cada 100000 nucleótidos. (Yáñez RJ et al. 1991.*Virus Res.*20:265–272 y Redrejo-Rodríguez M et al. J Virol. 2013 Sep;87(17):9780-7.

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

SI ☒

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

Se ha realizado la caracterización genómica de las preparaciones de stocks virales, purificados a partir de cultivos celulares, empleando secuenciación masiva (NGS)

para determinar la totalidad de material genético (DNA y RNA), constatando que no existía otra fuente de este material que no se correspondiese con el DNA del VPPA aislado Ba71V, que en este caso sería la cepa receptora o, de la célula Vero, que es la utilizada para la producción del virus. Además, se han realizado pruebas de detección de micoplasma con resultado negativo y se ha examinado la preparación del virus purificado al microscopio electrónico para comprobar el grado de pureza y descartar la presencia de bacterias o protozoos.

NO ☐

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

c. Modificación genética anterior:

SI ☐

– Describir:

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

NO ☒

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

Grupo 3. Aunque el VPPA es considerado un patógeno del grupo de riesgo 3, el proyecto presentado plantea el empleo de una cepa avirulenta (BA71V) como organismo receptor.

SI ☐

Para:

Humanos ☐

Animales ☐

Plantas ☐

Otros ☐

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

NO ☒

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

SI ☒ NO ☐

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

El aislado Ba71V del VPPA (Enjuanes et al. 1976. J Gen Virol 32, 471–477.) es un aislado atenuado, obtenido mediante pases sucesivos en cultivos de la línea célular Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano.

Se ha clasificado como avirulento, al no detectarse capacidad de infección en el hospedador original porcino. Se adjunta la referencia siguiente: Rodríguez JM, Moreno LT, Alejo A, Lacasta A, Rodríguez F, Salas ML. Genome Sequence of African Swine Fever Virus BA71, the Virulent Parental Strain of the Nonpathogenic and Tissue-Culture Adapted BA71V. PLoS One. 2015 Nov 30;10(11):e0142889. doi: 10.1371/journal.pone.0142889. Ver página 2 de la citada referencia donde se especifica incapacidad para infectar hospedador porcino de este aislado.

Así mismo, se adjunta certificación firmada por la Dra. María Luisa Arias, directora del Laboratorio de Referencia de la Unión Europea y la FAO para la Peste Porcina Africana, acreditando que el aislado BA71V no produce signos clínicos (necropsia), viremia (PCR) o producción de anticuerpos (ELISA) en cerdos domésticos inoculados con una dosis de 105 ufp/animal.

Nuestro grupo de investigación tiene experiencia previa en el uso y manipulación del aislado Ba71V del VPPA en las instalaciones autorizadas de alto nivel de contención biológica NCB3 del Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA). En concreto, durante los últimos cinco años se han obtenido y titulado varios stocks virales y purificado virus mediante ultracentrifugación para análisis bioquímicos y estructurales. Se han realizado además ensayos de detección mediante inmunofluorescencia, inmunomicroscopía electrónica, PCR, qPCR, citometría de flujo y western blot utilizando infecciones experimentales en células Vero. Adicionalmente, tenemos una larga trayectoria (más de 25 años) de experimentación con este y otros virus relacionados incluyendo la generación y uso de virus recombinantes en esta instalación así como en otros centros de investigación nacionales e internacionales.

Por otro lado, el CISA es una instalación de Alta Seguridad Biológica única en España, con niveles de contención NCB3 y NCB3/Plus (OMS) que forma parte de la Red de Laboratorios de Alta Seguridad Biológica (RLASB) en el mapa de Instalaciones Científico Técnicas Singulares (ICTS) del Ministerio de Ciencia e Innovación. Además, el CISA es Centro de Referencia para la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en el ámbito de la gestión de riesgos biológicos de laboratorios de alta seguridad biológica, Laboratorio de Referencia de la FAO para la Peste Porcina Africana y Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para la Peste Porcina Africana.

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:

Inactivación por calor (56ºC / 70 minutos o 60ºC / 20 minutos; inactivación por pH <3,9 ó > 11,5; susceptible a éter ó cloroformo; susceptible a desinfectantes.

iii) Posibles nichos ecológicos:

Dado que el aislado Ba71V del VPPA se ha obtenido por adaptación al crecimiento en células Vero en cultivo y en función de su incapacidad para causar una infección productiva en el hospedador porcino se considera que es poco probable que haya un nicho ecológico viable para el mismo.

iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

h. Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

Ninguna

ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Ninguna.

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

El aislado Ba71V no tiene distribución natural conocida. La distribución endémica de los aislados naturales de VPPA se limita a ciertos países del Africa subsahariana, en los que se encuentra en un ciclo replicativo que implica suidos salvajes africanos y garrapatas blandas y a la isla de Cerdeña en Europa. En la actualidad la distribución es global afectando a todos los continentes salvo la Antártida con niveles de incidencia cambiantes.

j. Hábitat natural del organismo:

Áreas del África subsahariana

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

Humanos	☐
Animal	☒
Planta	☒
Bacteria	☒
Hongo	☐
Virus	☐
Protozoos	☐

-Especificar el nombre científico y común:

Los organismos donantes de las secuencias a insertar son los siguientes: beta-glucuronidasa: *Arabidopsis thaliana*; beta-galactosidasa: *Escherichia coli*; hrGFPii-1: *Renilla reniformis*; EGFP: *Aequorea victoria*; mKate2: *Entacmaea quadricolor*; nLuc: *Oplophorus gracilirostris*

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI ☐ NO ☐

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

SI ☐

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

NO ☐

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

c. Modificación genética anterior:

SI ☐

– Describir:

☐

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

☐

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

☐

SI ☐ Para:

Humanos ☐

Animales ☐

Plantas ☐

Otros ☐

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

☐

NO ☐

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

SI ☐ NO ☐

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

☐

g. Método de obtención:

– Extracción ☐

– PCR ☐

– Síntesis *in vitro* ☐

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

☐

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

☐

IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

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

Anulación de le expresión génica de genes virales mediante la generación de virus recombinantes que carezcan parcial o totalmente de las secuencias codificantes correspondientes (mutantes de deleción). Cada uno de los OMGs generados presenta expresión anulada de un único gen.

2. Tipo de modificación genética:

- Inserción de material genético ☒
- Deleción de material genético ☒
- Sustitución de bases ☐
- Otros, especifique:

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

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

Otros, especifique:

Recombinación homóloga en la célula. El procedimiento implica transfectar con un plásmido de transferencia células infectadas por VPPA. Este vector de transferencia incluye la secuencia seleccionable a insertar flanqueada por regiones específicas que permitan la recombinación homóloga y así, la deleción de zonas específicas del genoma.

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 virus recombinantes de deleción se generarán con plásmidos construidos específicamente para cada uno de los genes a estudiar.

De manera genérica, para cada gen de interés se obtendrá un plásmido conteniendo dos secuencias de recombinación homóloga de entre 500 y 1000 pares de bases denominadas flanqueante izquierda y flanqueante derecha, que corresponderán a la zona situada en 5' del del gen bajo estudio y a la zona situada en 3' del mismo, separadas por un sitio de restricción único. Este sitio de restricción se utilizará para la inserción del "cassette de selección", que contiene los elementos necesarios para la identificación, selección y aislamiento de los virus recombinantes (gen reportero bajo el control del promotor viral tardío).

Esta estrategia se ha utilizado previamente, como se describe p.ej. en Oliveros M, García-Escudero R, Alejo A, Viñuela E, Salas ML, Salas J. African swine fever virus dUTPase is a highly specific enzyme required for efficient replication in swine macrophages. J Virol. 1999 Nov;73(11):8934-43. doi: 10.1128/JVI.73.11.8934-8943.

Los elementos reporteros a utilizar serán uno de los siguientes: beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, hrGFPii-1, EGFP, mKate2 ó nLuc. Así,se generarán plásmidos específicos para cada, gen cuyo mapa y elementos relevantes se muestran a continuación a modo de ejemplo y de manera esquemática para el gen A104R (ver mapa del plásmido pDelA104R).

Los plásmidos a emplear para la deleción de los demás genes seguirán los mismos conceptos de diseño y variarán solamente en las secuencias flanqueantes específicas empleadas. Se muestra una tabla con los nombres de los genes que se pretenden delecionar así como de las posiciones de inicio de cada uno de ellos en el genoma del aislado parental.

Plásmido pDel…

Anotación de los elementos funcionales del plásmido pDel…:

```
LOCUS       pDel…. 7166 bp    DNA     circular   13/11/2023
COMMENT     SerialCloner_Type=DNA
FEATURES             Location/Qualifiers
     misc_feature    3920..4655
                     /label=Del…_FlanqD
     misc_feature    1121..1706
                     /label=Del…_FlanqI
     misc_feature    2081..3892
                     /label=beta-glucuronidase
     misc_feature    1990..2062
                     /label=pr p72.4
     misc_feature    6178..7038
                     /label=AmpR
     misc_feature    5363..6030
```

/label=Col/E1/ori

Gen	Posición inicio

Tabla 1. Lista de posición relevantes para la generación de los OMGs. Se muestra el nombre del gen que se pretende delecionar y la posición de inicio del mismo en la secuencia del genoma parental.

ii) Si se trata de virus:

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

b. Gama de hospedadores del vector:

Bacterias *Escherichia coli*

c. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No contiene

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

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

Resistencia a ampicilina.

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

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

Las secuencias delecionadas son las correspondientes a la región codificante total o parcial de cada gen bajo estudio.

Las secuencias insertadas corresponden a la secuencia codificante de la proteína reportera correspondiente bajo el control de un promotor viral tardío previamente caracterizado en: Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein p72. J Virol. 1998 Apr;72(4):3185-95. doi: 10.1128/JVI.72.4.3185-3195.1998)

b. Información sobre los genes estructurales:

Los genes que codifican proteínas estructurales o reguladoras que se pretenden modificar son los siguientes: … (descritos en: Alejo A, Matamoros T, Guerra M, Andrés G. A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle. J Virol. 2018 Nov 12;92(23):e01293-18.

Secuencia genómica del aislado parental descrita en: Yáñez RJ, Rodríguez JM, Nogal ML, Yuste L, Enríquez C, Rodriguez JF, Viñuela E. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. Virology. 1995 Apr 1;208(1):249-78.)

c. Información sobre los elementos reguladores:

Los sitios de inicio y terminación de la transcripción de los genes bajo estudio han sido mapeados (Cackett G, Matelska D, Sýkora M, Portugal R, Malecki M, Bähler J, Dixon L, Werner F. The African Swine Fever Virus Transcriptome. J Virol. 2020 Apr 16;94(9):e00119-20.

Los promotores virales mencionados anteriormente se han caracterizado previamente en: García-Escudero R, Andrés G, Almazán F, Viñuela E. Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein p72. J Virol. 1998 Apr;72(4):3185-95 y García-Escudero R, Viñuela E. Structure of African swine fever virus late promoters: requirement of a TATA sequence at the initiation region. J Virol. 2000 Sep;74(17):8176-82..

d. ¿Ha sido secuenciada?

Si

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

No

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

No

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

a. Si el vector es un plásmido

i) Se pierde ☒

ii) Se inserta en el genoma ☐

- Aleatoriamente ☐
- En un sitio definido ☐
  - Localización cromosómica:
  - Secuencias colindantes:
  - La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

iii) Se mantiene en forma episómica ☐

- Número de copias:
- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

b. Si el vector es un virus:

i) Se mantiene en forma episómica ☐

ii) Se inserta en el genoma ☐

- La inserción se produce al azar ☐
- La inserción es específica ☐
  - Localización cromosómica:
  - Secuencias colindantes:
  - La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

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

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

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

ii) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA) ☐

iii) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas) ☒

V. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG)

1. Descripción del OMG final

Los OMGs generados son VPPA-Ba71V recombinantes que, de manera independiente, carecerán de expresión de una de las proteínas bajo estudio debido a la deleción total o parcial de los genes correspondientes.

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:

Los genes a modificar son componentes estructurales de la partícula viral por lo que es previsible que en su ausencia el OMG sea incapaz de replicar o su replicación esté comprometida en gran medida.

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.

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:

Beta-glucuronidasa. Alternativamente podrían tener uno de los siguientes marcadores: beta-galactosidasa, hrGFPii-1, EGFP, mKate2 ó nLuc.

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

La experiencia pasada nos indica que modificaciones similares en otros genes se han mantenido intactas durante años en los cuales se ha propagado el virus en las mismas células descritas para esta utilización

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

Nula o muy baja. Estos OMGs serán manipulados exclusivamente dentro de cabinas de cultivo (Categoría II) asignadas específicamente a nuestro grupo (no compartidas) en las instalaciones NCB3 del Centro de Investigación en Sanidad Animal. Su manipulación no coincidirá con la de

ningún otro patógeno y tanto las muestras infecciosas como los residuos de las infecciones experimentales se almacenarán o procesarán siguiendo los protocolos establecidos institucionalmente para el manejo de VPPA, que garantizan una biocustodia efectiva y una inactivación completa tras su utilización

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Detección de la presencia del gen marcador mediante adición del sustrato específico, 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-beta-D-galactopiranosido,5-bromo-4-cloro-3-indolil-ß-D-glucuronido ó furimacina. Detección directa de la presencia del gen marcador por microscopía de fluorescencia. PCR convencional con oligonucleótidos específicos para amplificar de manera diferencial con el virus parental las regiones modificadas en cada caso.

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

VI. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

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

i) La generación de los OMGs implica la infección de células Vero con el virus parental atenuado VPPA aislado Ba71V y la transfección con el vector de recombinación específico. A las 72 horas post-infección (hpi) se recogen las células infectadas y se utilizarán como inóculo para infectar nuevas monocapas de células Vero en un medio semisólido. Tras 4-6 días de incubación, se añadirá el sustrato colorimétrico pertinente (e función del marcador empleado en cada caso de ser necesario) para detectar la presencia de placas de lisis correspondientes al virus recombinante, que se seleccionarán por medios físicos y se utilizarán como inóculo en sucesivos pases de plaqueo para su enriquecimiento y aislamiento. Una vez concluida esta fase (generalmente entre 5 y 10 pases), los clones virales seleccionados se cultivarán a pequeña escala en células Vero para analizar su pureza e identidad. Finalmente, los aislados seleccionados se cultivarán a media escala para su uso en los ensayos de caracterización fenotípca que se describen a continuación:

ii) – ensayos de crecimiento en células Vero

iii) – ensayos de expresión de la proteína bajo estudio y otras proteínas virales mediante western blot o inmunofluorescencia en células Vero

iv) – ensayos de fenotipado mediante microscopía electrónica

v) – otros ensayos bioquímicos en función de los resultados de los ensayos anteriores

Todos los ensayos con virus vivos / activos se realizarán exclusivamente en cultivos celulares en cabinas de seguridad biológica de clase II y con equipos de protección individual.

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

Los lotes de virus obtenidos no superarán los 500ul con títulos esperados en el rango de 10^7-10^8 pfu/ml.

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

Se infectarán células en cultivo en placas multipocillos con volúmenes reducidos de entre 50 y 500 ul dependiendo del formato del ensayo. La cantidad total de cada virus por ensayo no superará las 10^8 pfu.

b. Número aproximado de plantas por ensayo:

c. Número aproximado de animales por ensayo:

3. Naturaleza de las operaciones:

a. Enseñanza ☐

b. Investigación ☒

c. Desarrollo ☐

4. Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

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

El proyecto tiene una duración de 3 años, con una posible extensión de un año adicional en el caso de que se solicite una prórroga, por lo que el uso de los OMGs en las actividades descritas no excederá un tiempo de 4 años.

VII. EVALUACIÓN DE RIESGO

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

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

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

a. Organismo receptor.

El organismo receptor es un aislado atenuado (Ba71V) del VPPA que no infecta o que causa una infección inaparente sin signos clínicos en el hospedador porcino. Las modificaciones propuestas en cualquier caso limitarían su capacidad de infección al tratarse de mutantes de pérdida de función en todos los casos.

b. Organismo donante.

No se utilizará organismo donante

c. Inserto.

Los insertos no tienen propiedades nocivas conocidas en relación con el OMG y no afectan a su capacidad replicativa o patogénica

d. Vector.

El vector no forma parte del OMG final.

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG[5]

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

La extensa bibliografía publicada indica que el VPPA es incapaz de infectar seres humanos (https://www.woah.org/en/disease/african-swine-fever/) o especies vegetales.

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

En relación a la sanidad animal, se considera que el aislado receptor BA71V es avirulento para el hospedador porcino (ver apartado III.1.f). Dado su elevado grado de atenuación (explicable por la pérdida de múltiples determinantes de la virulencia) y el bajo grado de patogenicidad en general de otros aislados de VPPA sobre sus posibles hospedadores invertebrados (garrapatas del género Ornithodoros) tampoco es previsible un efecto sobre el estado sanitario de estos últimos.

En todo caso, todas las modificaciones genéticas propuestas sobre el virus receptor comportan pérdidas de función, lo que reduciría ulteriormente cualquier hipotético efecto deletéreo para la salud (humana, animal o vegetal).

Otros efectos no relacionados directamente con la capacidad infecciosa de estos OMGs no son previsibles.

b. Efectos para el medio ambiente.

Dada la incapacidad previsible de los OMGs propuestos de infectar de manera productiva ningún organismo vivo presente en la naturaleza no se prevén efectos sobre el medio ambiente

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

Inoculaciones *in vitro* para producir stocks virales:

1) Infección de cultivos celulares con el OMG: Implica la apertura del tubo que contiene el OMG, la toma del volumen de OMG necesario para infectar la placa que contiene las células, y el transporte de estas placas infectadas de vuelta al incubador.

2) Recogida del virus producido y su purificación mediante centrifugación.

3) Desecho de las placas infectadas y residuos generados en el proceso.

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

La experimentación con muestras infecciosas se desarrollará exclusivamente en una cabina designada de cultivos de categoría II dentro del laboratorio de cultivos celulares L-22 en las instalaciones de alta contención biológica NCB3 del Centro de Investigación en Sanidad Animal.

Los cultivos de células infectadas se incubarán en un incubador designado de 37ºC situado en el mismo laboratorio.

Las muestras conteniendo material infeccioso (p.ej. stocks virales) se trasladarán a sus lugares designados de almacenamiento (congeladores, neveras) o procesamiento (centrífugas) dentro de las instalaciones NCB3 en contenedores sellados y siguiendo los protocolos de actuación específicos establecidos a tal fin.

Todo el material desechable utilizado durante la manipulación de muestras infecciosas será procesado siguiendo los protocolos de actuación establecidos para el manejo de VPPA que garantiza su inactivación en el mismo laboratorio L22 antes de su retirada por el personal asignado de seguridad biológica para su procesamiento y eliminación finales. Se garantiza así un doble proceso de inactivación en cualquier caso.

VIII. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA[6]

1. Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Todos los procedimientos relevantes se encuentran recogidos en el documento "Procedimientos de trabajo y seguridad" del servicio de seguridad biológica del Centro de Investigación en Sanidad Animal y están disponibles para su consulta para todos los implicados.

2. Formación del personal adscrito:

El personal adscrito a la instalación de NBC3 recibe información teórica y formación práctica previa al acceso a la instalación por parte de los técnicos responsables de la instalación siguiendo el procedimiento de formación y toma de conciencia SSB/03/GBIO/EXTERIOR y el procedimiento marco para incorporaciones al NCB3 SSB/01/LABORATORIO/NCB3. El personal adscrito realiza además una formación continua supervisada por el servicio de seguridad biológica del Centro de investigación en sanidad animal.

3. Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

La instalación NCB3 dispone de protocolos específicos de desinfección, descontaminación y esterilización que son llevados a cabo por personal técnico especializado bajo supervisión del responsable del servicio de seguridad biológica.

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

Se dispone de un control continuo por personal de mantenimiento formado en materia de bioseguridad.

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

El correcto funcionamiento de los sistemas de confinamiento y protección son verificados por el personal responsable del laboratorio y el servicio especializado de mantenimiento y anualmente es una empresa externa la que realiza trabajos de validación y emite los informes pertinentes.

IX. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1. Encargado de la gestión de residuos:

a. Gestión interna: SÍ ☒ NO ☐

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

La instalación NCB3 dispone de protocolos específicos de inactivación y gestión interna de los residuos. En general, todos los residuos se descontaminarán inicialmente mediante tratamiento químico (Virkon, Persafe) antes de salir de las cabinas de bioseguridad. Posteriormente, los residuos líquidos y sólidos son segregados y recogidos por personal técnico especializado que garantiza su inactivación por métodos químicos y físicos tal como

[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.

recogen los procedimientos de descontaminación correspondiente antes de su retirada del laboratorio NCB3.

b. Gestión por una empresa externa: SÍ ☒ NO ☐

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

HIBISA-*Higiénica de Biosanitarios*S.L. - CIF: B87068961

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA

1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

En el manual de Bioseguridad están contemplados los pasos a seguir en caso de incidente o accidente y serán conocidos éstos por todos los usuarios.

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Equipos de protección individual de un solo uso (guantes de nitrilo, manguitos), rotores con tapas estancas antiaerosoles, contenedores herméticos, cabinas de bioseguridad de tipo II,

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

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

4. Planes de emergencia y contingencia:

Existe un “Plan de emergencia y evacuación” específico de la instalación conocido y accesible a todo el personal que a ella accede.