



PARTE A Y C

DIRECCION GENERAL CALIDAD Y
EVALUACIÓN AMBIENTAL

**Actividades de
tipo 3 y 4**

COMISIÓN NACIONAL DE
BIOSEGURIDAD

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

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Responsables de la actividad

a. Entidad

Nombre: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries – Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CReSA).

Dirección postal: Edifici CReSA, Campus de la UAB, 08193 Bellaterra, Barcelona

b. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: **Josep Usall Rodié**

NIF: **40.893.753-Y**

Cargo: **Director General de IRTA**

Tel: **93.467.40.40**

Correo electrónico: Josep.usall@irta.cat

c. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: **Enric Vidal Barba**

NIF: **45.492.675-D**

Cargo: **Investigador**

Tel: **93.467.40.40 (1784)**

Correo electrónico: Enric.vidal@irta.cat

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

Nombre y apellidos: **Xavier Abad Morejon de Giron**

NIF: **35.082.196-C**

Cargo: **Jefe Unidad Alta Contención Biológica y Laboratorios NBS2**

Tel: **93.467.40.40 ext 1712**

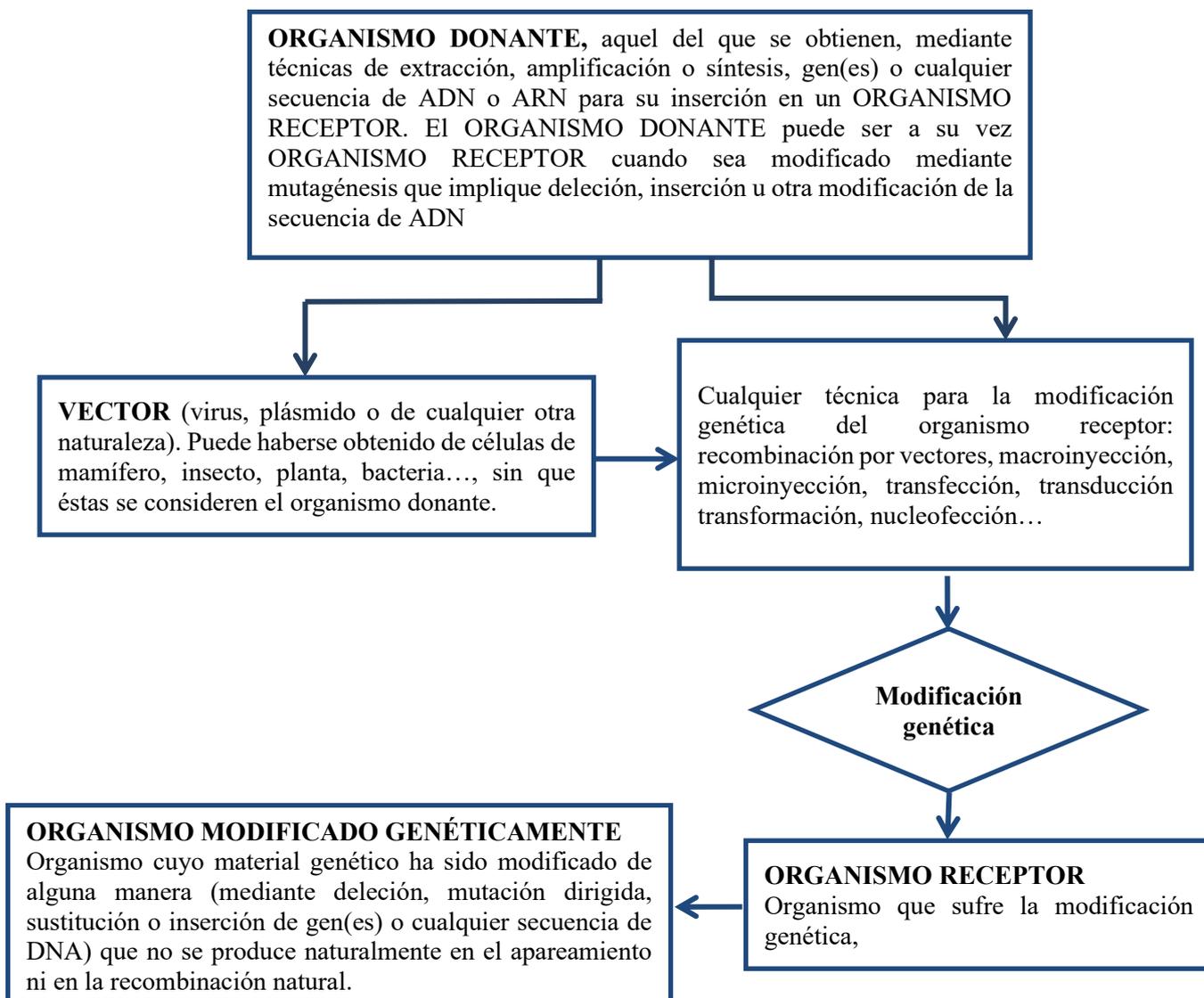
Correo electrónico: xavier.abad@irta.cat

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

Xavier Abad Morejón de Girón



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

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-..):

- Fecha de autorización de la instalación:

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-...):

A/ES/14/I-29

- 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:

En cumplimiento de la legislación española y europea relativa al transporte de Organismos Modificados Genéticamente (OMG) en el que se incluyen los virus adeno-asociados, adoptaremos las siguientes medidas durante el transporte:

El transporte de virus adeno-asociados se llevará a cabo siguiendo las pautas establecidas para el transporte de sustancias biológicas peligrosas. Esto incluye la clasificación de los OMG y la selección adecuada del medio de transporte y contenedores.

Durante el transporte de virus adeno-asociados, se seguirán los procedimientos de manipulación y embalaje recomendados por las autoridades competentes y de acuerdo con las regulaciones de seguridad biológica. Los virus adeno-asociados se almacenarán y transportarán en contenedores herméticos (3 capas/contenedores) y seguros que evitarán la liberación accidental.

El transporte de los virus adeno-asociados se realizará con la documentación de acompañamiento requerida por la legislación. Esta documentación incluye la descripción detallada de los OMG transportados, su origen, destino, y los protocolos de seguridad necesarios para su manipulación segura.

En relación con la identificación y el etiquetado, los contenedores que albergarán los virus adeno-asociados estarán debidamente etiquetados y marcados de acuerdo con las regulaciones de seguridad biológica y OMG. Esto incluye la identificación clara de los contenidos y cualquier peligro asociado.

3. Finalidad de la actividad:

Inoculación de ratones transgénicos para la proteína prión (modelos K.O. de la PRNP murina con el gen PRNP de otras especies: Topillo rojo (*Myodes glareolus*), Oveja (*Ovis aries*), Humano (*Homo sapiens*), ciervo mulo (*Odocoileus hemionus*) o del mismo ratón (*Mus musculus*) pero modificada genéticamente (TgMoL108I), por vía intravenosa con virus adeno asociados (AAV) con proteína prión con distintas mutaciones para hacerlas dominantes negativas. El objetivo sería bloquear el malplegamiento de la proteína prión en modelos de enfermedad priónica. Para ello, tras la inoculación con AAV los animales serán inoculados con distintos aislados priónicos).

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 finalidad del proyecto es comprobar si la expresión de proteínas prion modificadas genéticamente y expresadas en un virus adeno-asociado (AAV) puede ejercer un efecto dominante negativo y evitar o atrasar el desarrollo de una enfermedad priónica (ya sea en forma de profilaxis o tratamiento).

El riesgo biológico de la actividad no reside tanto en los virus adeno-asociados modificados sino también en los aislados priónicos que van a ser utilizados posteriormente para comprobar el efecto dominante negativo de las proteína que llevan los AAV, inóculos que listamos a continuación:

RML: cepa experimental de scrapie adaptada a ratón generada en Rocky Mountain Laboratory.

btML: cepa experimental de prion murino generada en CICbioGUNE.

FFI: aislado de paciente humano con insomnio fatal familiar (de forma directa y tras su adaptación al modelo murino TgVole, que expresa la proteína prion de topillo rojo).

gCJD: aislado de paciente humano con la variante genética (E200K) de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (de forma directa y tras su adaptación al modelo murino TgVole).

CWD-Vole: aislado de la caquexia crónica de los cervidos (CWD) adaptada experimentalmente al modelo murino TgVole.

Este formulario ha sido rellenado bajo el siguiente marco:

OMG: ratón transgénico inoculado con AAV que le hace expresar una nueva proteína priónica

Organismo receptor: modelos de ratón transgénico

Organismo donante: especies de las cuales se obtienen las secuencias de proteína priónica que llevan los AAV.

Vector: los AAV

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 Detallar las líneas celulares:

Células: otras Detallar las líneas celulares:

Animal

Planta



- Bacteria
- Hongo
- Virus
- Protozoos

-Especificar el nombre científico y común:

Raton (*Mus musculus*).

a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i) Técnicas de aislamiento: No procede
- ii) Técnicas de identificación: PCR
- iii) Marcadores genéticos: detección del gen prnp insertado en cada caso
- iv) Marcadores fenotípicos: No procede
- v) Estabilidad genética: PCR

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

SI

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

Las colonias de ratones mencionadas arriba, se mantienen en el estabulario del CICbioGUNE con un estricto control sanitario, aunque no son colonias SPF.

NO

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

c. Modificación genética anterior:

SI

- Describir:

Se van a utilizar ratones transgénicos para la proteína prión (modelos K.O. de la PRNP murina con el gen PRNP de otras especies: Topillo rojo (*Myodes glareolus*), Oveja (*Ovis aries*), Humano (*Homo sapiens*), ciervo mulo (*Odocoileus hemionus*) o del mismo ratón (*Mus musculus*) pero modificada genéticamente (TgMoL108I).

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

Estos modelos transgénicos no tienen ningún fenotipo, mas allá de una distinta susceptibilidad a ciertas cepas priónicas.)

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):

NO

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:

Estos modelos transgénicos están bien caracterizados y han sido utilizados en múltiples bioensayos.

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:

iii) Posibles nichos ecológicos:

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*):



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

[]

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

Ratón (*Mus musculus*) - Mundial

j. Hábitat natural del organismo:

El mismo que el de los ratones silvestres (ciudad, campo, etc.)

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

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

-Especificar el nombre científico y común:

Se relacionan aquí las especies de las cuales se obtienen las secuencias del gen PRNP para expresar distintas variantes modificadas de proteína priónica en los virus adeno-asociados:

Topillo rojo (*Myodes glareolus*)

Humano (*Homo sapiens*)

Ciervo mula (*Odocoileus hemionus*)

Ratón (*Mus musculus*)

Oveja (*Ovis aries*)

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI NO

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

SI X

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

La unidad responsable de su preparación realiza los pertinentes estudios de control que permite asegurar que las células no están infectadas con ningún otro virus, bacteria, micoplasma o levadura

NO



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

c. Modificación genética anterior:

SI

- Describir:

- **A continuación se listan las modificaciones que se pretenden utilizar para cada especie donante:**
- **AAVs que expresan la PrP de topillo rojo con las sustituciones aminoacídicas:** 14 secuencias con distintas modificaciones aminoacídicas
- **AAVs que expresan la PrP de humano con las sustituciones aminoacídicas:** 3 secuencias con distintas modificaciones aminoacídicas
- **AAVs que expresan la PrP de ciervo mula con las sustituciones aminoacídicas:** 3 secuencias con distintas modificaciones aminoacídicas
- **AAVs que expresan la PrP de ratón con las sustituciones aminoacídicas:** 2 secuencias con distintas modificaciones aminoacídicas
- **AAVs que expresan la PrP de oveja con las sustituciones aminoacídicas:** 3 secuencias con distintas modificaciones aminoacídicas.

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

Se busca un efecto dominante negativo, es decir son proteína prion celular diseñadas con el objetivo de que no se malplieguen a la forma patógena.

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 organismo son los animales a partir de los que se obtiene el gen de la proteína prion. Es una proteína que se expresa de forma normal en todos los organismos. Aunque está relacionada con la patogenia de las EET, por sí misma no causa enfermedad.

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.):

Gen codificante de la PrP, con distintas modificaciones aminoacídicas (listadas en el punto 1)

g. Método de obtención:

– Extracción

– PCR

– Síntesis *in vitro*

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

La función de la proteína prion celular no es clara, se conoce que tienen un dominio de unión a metales que participa en la homeostasis del cobre en el espacio sináptico, pero los animales PrPC-KO son prácticamente normales, excepto que son resistentes a las enfermedades priónicas.

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

No



IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

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

Expresar proteínas prion modificadas genéticamente para que ejerzan un efecto dominante negativo e impidan el malplegamiento de la proteína prion celular en distintos modelos de ratón transgénico tras su inoculación con diferentes aislados priónicos.

2. Tipo de modificación genética:

- Inserción de material genético
- Delección de material genético
- Sustitución de bases X
- Otros, especifique:

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

- Transformación
- Electroporación
- Macroinyección
- Microinyección
- Infección X
- Transfección
- Fusión celular

Otros, especifique:

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

SÍ X NO

En caso afirmativo:

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

AAV modificados para evitar su multiplicación y propagación en el organismo.

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.

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.

Los virus rAAV9P31 se van a generar en células HEK293T, que se van a co-transfectar con 3 virus diferentes: uno que contiene la secuencia de interés (Transfer plasmid, Gene Of Interest GOI), rep-cap plasmid (necesario para la replicación y encapsulación del AAV) y un helper plasmid. Dentro del GOI se va a incluir una secuencia de resistencia a kanamicina (para la selección del mismo), un promotor de sinapsina humana u otros específicos de célula (fundamentalmente neuronas) para que el recAAV sólo se exprese en neuronas y diferentes vectores relacionados con el empaquetamiento del ssDNA.

b. Gama de hospedadores del vector:

Cualquier mamífero

c. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

Al producirse los AAV en células empaquetadoras (a través de la utilización de plásmidos que expresan las proteínas de la envuelta viral) no sería posible que salieran del organismo infectado

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

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

Podría transferir una resistencia a kanamicina, pero al producirse los AAV en células empaquetadoras (a través de la utilización de plásmidos que expresan las proteínas de la envuelta viral) no sería posible que salieran del organismo infectado.

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

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

Cada AAV porta una proteína prion modificada genéticamente para que ejerza un efecto dominante negativo e impida el malplegamiento de la proteína prion celular.

b. Información sobre los genes estructurales:

No tienen por seguridad, de forma que se evite la propagación de los virus entre diferentes células del mismo individuo o entre individuos. Para poder generarse estos virus se producen en células HEK293T empaquetadoras especiales que portan los genes de la cápsula del virus.

c. Información sobre los elementos reguladores:

Entre ellos se incluye una secuencia de resistencia a kanamicina (para la selección del mismo), un promotor de sinapsina humana u otros específicos de célula (fundamentalmente neuronas) para que el recAAV sólo se exprese en neuronas y diferentes vectores relacionados con el empaquetamiento del ssDNA

d. ¿Ha sido secuenciada?

Sí.



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

No.

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

No.

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

a. Si el vector es un plásmido

i) Se pierde

ii) Se inserta en el genoma

- Aleatoriamente

- En un sitio definido

o Localización cromosómica:

o Secuencias colindantes:

o 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

o Localización cromosómica:

o Secuencias colindantes:

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



[]

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

[No, puesto que no posee los genes necesarios para la formación de la cápside.]

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)
- iii)** Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas) X



V. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG)

1. Descripción del OMG final

Mediante AAV vamos a modificar ratones transgénicos que ya portaban modificaciones para la proteína prion (modelos K.O. de la PRNP murina con el gen PRNP de otras especies: Topillo rojo (*Myodes glareolus*), Oveja (*Ovis aries*), Humano (*Homo sapiens*), ciervo mulo (*Odocoileus hemionus*) o del mismo ratón (*Mus musculus*) pero modificada genéticamente (TgMoL108I). Una vez infectados con el AAV van a expresar la proteína prion que ya expresaban, más otra que nosotros hemos incluido en el AAV. Es decir, que van a expresar dos proteínas prion diferentes, la “endógena” del modelo transgénico que ya tenía más la nueva que nosotros le hemos introducido mediante AAV en forma de episomas.

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 se esperan diferencias.

- 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

- 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:

Presencia de proteína prion diferente a la endógena. Se puede detectar por diferentes pruebas genéticas (PCR específica o secuenciación) o bioquímicas (western blot con anticuerpos específicos).

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

No se va a transmitir a la descendencia. El animal se va a infectar con los AAV y en ningún caso estos van a salir del organismo ni esos animales se van a emplear para criar.

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

No es posible, ya que no posee los genes estructurales necesarios para formar la cápside.



5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Se identificarán los animales que expresan la proteína introducida mediante el vector AAV por western blot utilizando anticuerpos específicos para identificar esta proteína prion y diferenciarla de la endógena.

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

Estos animales en ningún caso saldrán de las instalaciones de seguridad del animalario de la Unidad de Alta Biocontención del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries – Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CReSA).



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).

Inoculación de ratones transgénicos para la proteína prión (modelos K.O. de la PRNP murina con el gen PRNP de otras especies: Topillo rojo (*Myodes glareolus*), Oveja (*Ovis aries*), Humano (*Homo sapiens*), ciervo mulo (*Odocoileus hemionus*) o del mismo ratón (*Mus musculus*) pero modificada genéticamente (TgMoL108I), por vía intravenosa con virus adeno asociados (AAV) con proteína prion con distintas mutaciones para hacerlas dominantes negativa (con objetivo de bloquear el malplegamiento de la proteína prion en modelos de enfermedad priónica).

Tras la inoculación con AAV los animales serán inoculados con distintos aislados priónicos.

Los AAV que se van a probar están diseñados para expresar en estos modelos las siguientes proteínas:

AAVs que expresan la PrP de topillo rojo con las sustituciones aminoacídicas:

14 combinaciones distintas de sustituciones en varios aminoácidos

AAVs que expresan la PrP de humano con las sustituciones aminoacídicas:

3 combinaciones distintas de sustituciones en varios aminoácidos

AAVs que expresan la PrP de ciervo mula con las sustituciones aminoacídicas:

3 combinaciones distintas de sustituciones en varios aminoácidos

AAVs que expresan la PrP de ratón con las sustituciones aminoacídicas:

2 combinaciones distintas de sustituciones en varios aminoácidos

AAVs que expresan la PrP de oveja con las sustituciones aminoacídicas:

3 combinaciones distintas de sustituciones en varios aminoácidos

Los aislados priónicos que se van a inocular en los modelos propuestos incluyen:

RML: cepa experimental de scrapie adaptada a ratón generada en Rocky Mountain Laboratory.

btML: cepa experimental de prion murino generada en CICbioGUNE.

FFI: aislado de paciente humano con insomnio fatal familiar (de forma directa y tras su adaptación al modelo murino TgVole, que expresa la proteína prión de topillo rojo).

gCJD: aislado de paciente humano con la variante genética (E200K) de la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (de forma directa y tras su adaptación al modelo murino TgVole).

CWD-Vole: aislado de la enfermedad caquetizante crónica de los cervidos (CWD) adaptada experimentalmente al modelo murino TgVole.

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

--



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

Inoculación intravenosa. 100ul de suspensión de AAV por ratón.

b. Número aproximado de plantas por ensayo:

c. Número aproximado de animales por ensayo:

Grupos de 12 ratones,

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).

Los estudios se iniciarán en 2024, se prevé una duración mínima de tres años.

Todos los experimentos se realizarán en las instalaciones de alta seguridad del CReSA una vez aprobados por los comités de experimentación animal (IRTA y Generalitat de Catalunya), el comité de Bioseguridad del IRTA y la Comisión Nacional de Bioseguridad

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.

Los virus adeno-asociados no son patógenos por sí solos, sin embargo, no se pueden descartar potenciales efectos adversos en el organismo receptor (ratón) asociados a la expresión de una proteína prion celular exógena en grandes cantidades (reacciones inmunogénicas / hipersensibilidad, neurotoxicidad, patología asociada a la sobreexpresión de PrPc...).

b. Organismo donante.

Se trata de secuencias de genes que expresan proteína prion celular, una proteína endógena normal.

c. Inserto.



No aplica pues se trata de genes que expresan proteína prion celular, una proteína endógena normal, modificada con la intención de bloquear el malplegamiento.

d. Vector.

Los AAV no son patógenos, se consideran microorganismos de grupo de riesgo 1.

2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG⁵

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

Muy bajo o nulo, puesto que no expresan ninguna proteína peligrosa para el individuo, sin embargo, no se pueden descartar potenciales efectos adversos en el organismo receptor (ratón) asociados a la expresión de una proteína prion celular exógena en grandes cantidades (reacciones inmunogénicas / hipersensibilidad, neurotoxicidad, patología asociada a la sobreexpresión de PrPc...). Por otro lado, los AAV son incapaces de propagarse por el organismo ni entre individuos ya que no poseen la información para generar una cápside que les permita salir de las células en las que están alojados para infectar otras. Finalmente, también cabe destacar que no son virus con infectividad demostrada por vía aérea. Se deben inocular por vía intravenosa por lo que el riesgo de una infección accidental es muy bajo. En caso de derrame sería sencillo desinfectar con Virkon + etanol, o PERAsafe + etanol, la superficie contaminada. El serotipo de AAV utilizado no infecta a seres humanos.

b. Efectos para el medio ambiente.

De nuevo, el riesgo es muy bajo o nulo, puesto que los virus en ningún caso van a estar fuera de las condiciones de seguridad del laboratorio y, en todos los casos, se inactivarán los restos que pueda haber (papeles contaminados, tubos semivacíos, etc.) por incineración junta al resto de residuos del estabulario de priones. En el caso del transporte o almacenaje, este se realizará en contenedores herméticos (3 capas/contenedores) y seguros que evitarán la liberación accidental. Finalmente, los residuos se desecharán de acuerdo con la legislación vigente. En el improbable caso de que los virus lleguen a la naturaleza, suponen un riesgo mínimo, puesto que no se transmiten por vía aérea y no expresan ninguna proteína peligrosa para el individuo.

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

Las fases más críticas son la inoculación de los ratones con las distintas cepas priónicas propuestas (agentes de nivel 3 de biopeligrosidad), así como la manipulación de los encéfalos en aquellos animales que desarrollan enfermedad priónica. En particular el corte con microtomo de los encéfalos fijados en formol y embebidos en parafina. En cuanto a la manipulación de los virus adeno-asociados no se considera una fase crítica ya que son de nivel de bioseguridad 1 (ver punto 1.d.).

En todo caso, todas las actividades y fases de los ensayos previstos con el OMG se harán en las instalaciones de alta bioseguridad de nivel 3 del IRTA-CReSA. Las características de la actividad son un uso confinado del OMG para inoculación en animales de experimentación, y obtención de muestras y su procesado. El confinamiento será el típico de una unidad de Alta Biocontención de grandes animales (con duchas obligatorias de salida, filtración absoluta el aire, descontaminación química de los efluentes y eliminación de las carcasas infectadas por digestión alcalina o incineración). En el caso de los ratones utilizados serán incinerados. Todas estas barreras de confinamiento y control garantizan su no diseminación al exterior, por tanto, nulo impacto

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



ambiental. Todos los residuos generados serán objeto de recogida por gestores autorizados. En los que respecta a la exposición humana, el riesgo es muy bajo, pero el personal en los boxes experimentales trabajará con mono de trabajo Tyvek sobre la indumentaria de la instalación, calzado dedicado, doble guante, protección ocular y mascarilla quirúrgica, EPIs que se mantendrán en laboratorio. En ambos casos, la mayoría de las actividades se ejecutarán dentro de cabina de seguridad biológica.

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

Todas las operativas en las que se manipulen priones se harán en el interior de la unidad de alta contención biológica del IRTA-CReSA (Nivel 3) que dispone de un laboratorio exclusivo para la manipulación de priones y un estabulario exclusivo para los bioensayos con priones que cumplen con toda la normativa para el trabajo con estos agentes. Todas las manipulaciones, incluida la inoculación de hacen bajo cabina de seguridad biológica; las dos cabinas dedicadas FASTER CR-0428 y TELSTAR Bio-IIA de CR-0762 están sujetas a verificación anual por empresa externa autorizada. El personal dispone a la entrada de ambos recintos de: monos impermeables de un solo uso, cambio de calzado, doble guante y protección de mucosas (gafas de seguridad + mascarilla). Para las inoculaciones intracerebrales se añaden guantes antipinchazo en los dedos que sujetan el ratón.

Los AAV se van a utilizar exclusivamente en cabina de seguridad biológica (flujo laminar) y en la sala de estabulado de roedores para la línea de priones dentro de la unidad de alta contención biológica del IRTA-CReSA (Nivel 3). Sólo se van a utilizar para la inoculación intravenosa directa de los mismos en modelos de ratón transgénico para el gen PRNP, por lo que el riesgo se reduce a un pinchazo accidental con la punta de la aguja. Para evitarlo, se tomarán las medidas adecuadas (guantes anti-pinchazo, doble guante, bata, etc). Una vez los AAV se encuentren en los animales el riesgo es nulo, puesto que estos virus no pueden transmitirse entre individuos.

Confinamiento secundario y elementos de biocontención/protección: cascada de presiones negativas en la Unidad de Alta Biocontención. Boxes experimentales independientes con puertas con junta neumática y con sus propios sistemas de ducha y vestuarios; filtración absoluta independiente para cada box. Acceso del personal a la Unidad solamente si tienen activado su perfil biométrico y configurada para ese acceso

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

1. Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

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

2. Formación del personal adscrito:

El personal experimental adscrito tiene experiencia probada desde hace muchos años en el manejo de infecciones experimentales con priones, bacterias y virus patogénicos. El personal al cargo de las

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.



Para CReSA-NBS3:

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

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

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

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

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

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

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

En lo que respecta a área priones, todos los residuos no valorizables (EPIs, material de desinfección, plásticos de un solo uso, etc.) son descartados en contenedores de grupo IV con destino incineración y son recogidos por empresa de tratamiento autorizada. Las jaulas, y otros elementos de estabulación, son autoclavadas en las anteriormente mencionadas autoclaves MATACHANA, en ciclos de 134,5°C por tiempo 60 minutos antes de ser limpiadas y reutilizadas. Los residuos de estabulación pueden ser incinerados en el propio incinerador de la instalación.

b. Gestión por una empresa externa: SÍ NO

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

PREZERO.



Todos los residuos del laboratorio de priones (Priocat) y box 0 (específico para bioensayos con priones) serán considerados de tipo IV (citostáticos-biopeligrosos). Su recogida la gestionará una empresa externa que es quien proporcionará los mismos bidones de 60 litros específicos para este tipo de reactivos. A medida que se llenen bidones se cerrarán, se descontaminará la superficie con lejía al 50% (rociar el bidón con una botella nebulizadora y dejarlo en contacto una hora), y se sacarán a través del SAS, en un ciclo adicional de desinfección. Los bidones llenos y cerrados se almacenarán en la entrada de muestras, una zona de acceso restringido, hasta el momento de su recogida por parte de una empresa autorizada de gestión de residuos (opcionalmente se pueden almacenar en la cámara fría de la sala de necropsias de la unidad de Alta Biocontención para evitar mal olor hasta el momento de sacarlos a través del SAS).

X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA

1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Inoculación percutánea accidental de priones o virus adeno-asociados o contacto con mucosa ocular oral o nasal. Las fases críticas serían: inoculación intracerebral de priones a los ratones, extracción de muestras biológicas de los ratones infectados con priones durante la necropsia, manipulación de las muestras para su análisis, en particular el corte al microtomo ya que incluye una cuchilla. Menos crítica es la fase de inoculación intravenosa de virus adeno-asociados.

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

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

Toda manipulación, incluida la inoculación de priones y de virus adeno-asociados, así como la manipulación de los animales inoculados, se realiza bajo cabina de seguridad biológica dentro de la unidad de alta contención biológica de nivel 3 que dispone de laboratorio (Priocat) y estabulario (Box 0) específico para priones. Mono desechable, doble guante de latex y nitrilo, pantalla o gafas de seguridad, máscara quirúrgica. Guantes antipinchazo para la inoculación, Guante anticorte para la manipulación de las muestras de encéfalo.

Se extremen las precauciones durante el uso de cuchillos y objetos punzantes (bisturí con mango de un solo uso, jeringuillas, agujas esposadas...). Utilizar guantes anti-corte/anti-pinchazo. No reponer nunca el capuchón de la jeringa/bisturí una vez extraído y descartar las agujas en el contenedor amarillo dedicado a este fin.

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

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

A parte de la formación periódica en bioseguridad que recibe todo el personal que trabaja en la unidad de Alta Biocontención del IRTA-CReSA, se realiza un seminario anual de formación



para el trabajo con agentes priónicos a todo el personal que entra al laboratorio de priones y al estabulario con ratones inoculados con priones.

4. Planes de emergencia y contingencia:

Hay un plan de emergencia aprobado a disposición del personal.

En caso de heridas con material contaminado con priones:

- En caso de heridas con solución de continuidad de la piel se debe limpiar la herida con agua corriente permitiendo el sangrado de la misma, sumergir la herida en una solución de lejía estándar comercial (Concentración final de hipoclorito sódico de 5% o 50.000ppm, la normativa habla de 20.000ppm, por lo que se puede usar una solución al 50%) unos 5 minutos y finalmente desinfectarla con povidona yodada y cubrir con apósitos resistentes al agua.

- Ante cualquier herida es necesario: 1º: Informar a los responsables de Alta Biocontención; 2º: Buscar, si es necesario, asistencia médica, con el asesoramiento de los responsables de Alta Biocontención; 3º: Cumplimentar un registro de incidencias en colaboración con el personal de Gestión de Alta Biocontención para realizar análisis de causas y soluciones posibles (R-A4-GGC 004-01).