



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

Nº de Notificación:

**I. INFORMACIÓN GENERAL**

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

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

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

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: **Esther Esteban Rodrigo**

NIF: **05271582M**

Cargo: **Directora del INIA**

Tel:

Fax:

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

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: **Francisco Javier Ortego Alonso**

NIF: **50165853R**

Cargo: **Científico Titular de OPIs**

Tel: **91 6202300**

Fax: **91 6202247**

Correo electrónico: **ortego@inia.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**

Fax: **91 6202247**

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

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



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

01/2020 Rev 11

SI  NO

Si la respuesta a la pregunta anterior es **SI**, debe justificarlo especificando<sup>1</sup>:

- Nombre de la convocatoria: **Convocatoria 2020 Proyectos de I+D+i - RTI Tipo RTA**
- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: **PID2020-112992RR-I00. IP: Francisco Javier Ortego Alonso**
- Organismo financiador: **Ministerio de Ciencia e Innovación.**

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

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

## II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Finalidad de la actividad:

**Desarrollo de virus vaccinia MVA recombinantes que expresen distintas proteínas del virus de la lengua azul (BTV), que van a ser testados posteriormente como candidatos vacunales. El objetivo de la actividad es analizar la respuesta inmune protectora de vacunas basadas en virus vaccinia modificado Ankara (MVA) recombinantes que expresen distintas proteínas del virus de la lengua azul (BTV) frente a la infección con distintos serotipos del virus. Para ello se realizarán ensayos de patogenicidad y protección en ratones susceptibles a la infección viral que mimetizan la enfermedad severa observada en ovejas así como en ovejas, huésped natural del virus. Estos ratones susceptibles están modificados genéticamente para no expresar el gen que codifica el receptor humano de interferón tipo I. La eficacia de los candidatos vacunales o antivirales se determinará en este modelo animal murino IFNAR(-/-) y en ovejas. Para conseguir estos objetivos, el único modelo experimental que se puede utilizar son animales.**

---

<sup>1</sup>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.



El modelo animal consiste en ratones Knockout IFN $\alpha$ / $\beta$ R-/- (A129) procedentes de laboratorios MARSHALL BIORESOURCES (<https://www.marshallbio.com/mice>), que no expresan el gen del receptor de interferón IFN $\alpha$ / $\beta$  (Tipo I).

Para los ensayos de inmunogenicidad y protección se usarán virus MVA recombinantes que expresan las proteínas de BTV. Se realizarán protocolos utilizando una sola dosis o dos dosis de los candidatos vacunales espaciadas 4 semanas. La construcción de los virus MVA recombinantes utilizados como candidatos vacunales frente a BTV, se realizarán en las 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.

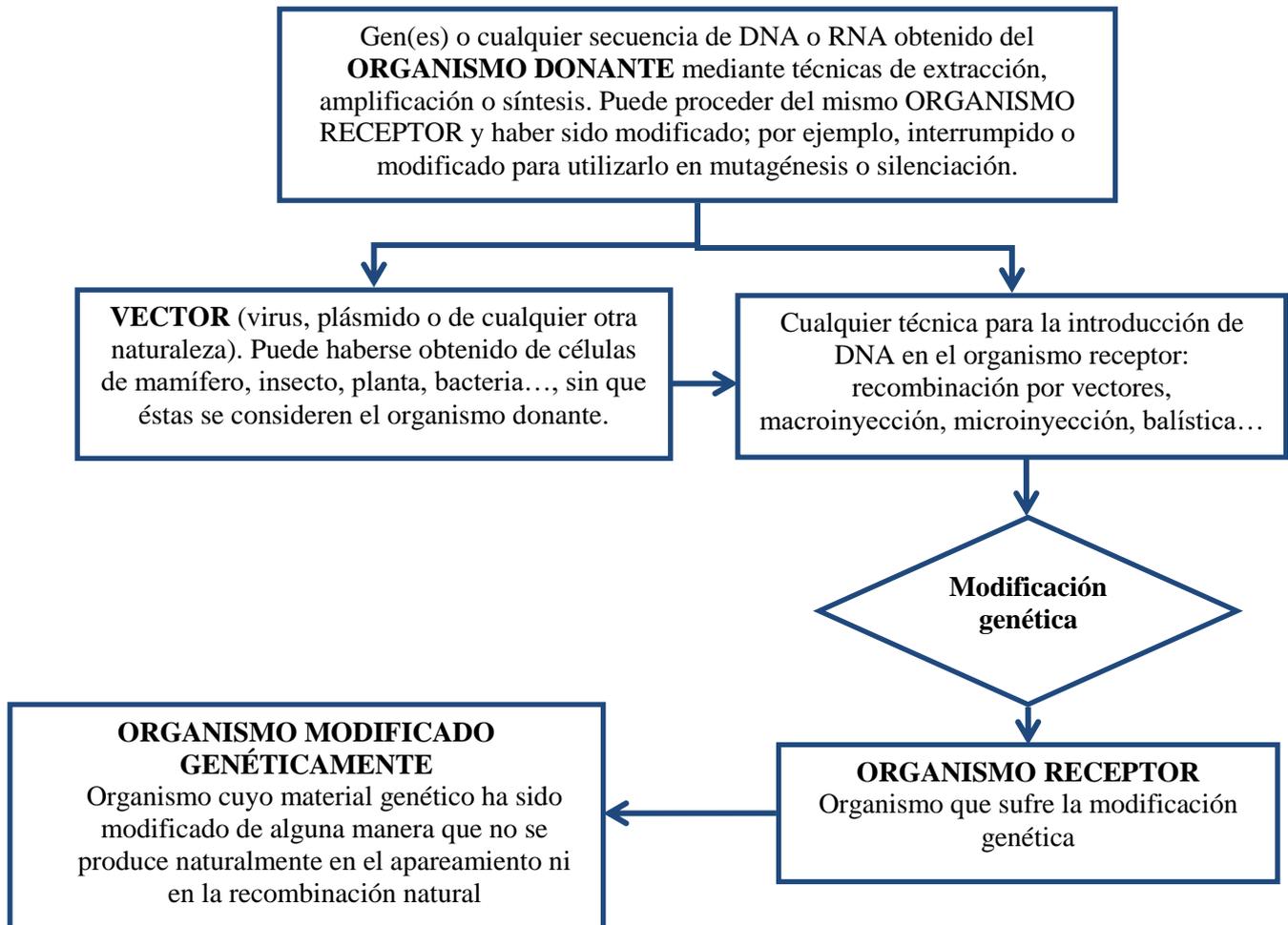
2) Clasificación de la actividad:

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

- Tipo 1
- Tipo 2
- Tipo 3
- Tipo 4



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





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

- 1) Nombre científico: **El organismo receptor son los virus MVA-- $\Delta$ F3L, MVA- $\Delta$ A27L y MVA- $\Delta$ A27L-  $\Delta$ F13L que son derivados de la cepa vacunal MVA por delección de los gen F13L y/o A27L lo que produce una disminución en el tamaño de la placa en cultivo.**

Taxonomía: **Familia Poxviridae. Género Orthopoxvirus**

Nombre común: **Virus vaccinia modificado Ankara (MVA)**

- 2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento: **Infecciones en cultivos celulares. Los virus rMVA-CoV2 serán utilizados para infectar cultivos de células permisivas [DF-1(línea celular establecida de células de pollo).**

b) Técnicas de identificación: **PCR, secuenciación, western blot, ELISA.**

c) Marcadores genéticos: **No aplica**

d) Marcadores fenotípicos: **No aplica**

e) Estabilidad genética: **El MVA es estable en cultivos celulares.**

- 3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

**Se utilizarán virus MVA en los que los genes F13L y A27L han sido sustituidos por genes que codifican una proteína fluorescente:**

- **MVA- $\Delta$ F13L por delección del gen F13L e introducción del gen dsRed (rojo)**

- **MVA- $\Delta$ A27L por delección del gen A27L e introducción del gen TagBFP (azul) y**

- **MVA- $\Delta$ A27L- $\Delta$ F13L por delección de ambos genes e introducción de dsRed y TagBFP.**

- 4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI

NO

- 5) En caso afirmativo, especificar para qué clase de los organismos (*seres humanos, animales, plantas*) se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos extracelulares:

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



- a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad? **No aplica.**
- b) En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI  NO

Por qué: **No existe probabilidad de reversión de la atenuación.**

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

**Es un virus clonado y expandido en cultivos. Los cultivos están testados rutinariamente para bacterias y micoplasmas.**

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

**El grupo de investigación del INIA-CISA que manipulará el OMG posee una dilatada experiencia en trabajos de investigación, desarrollo y actividades científicas y técnicas utilizando vectores virales vacunales. El grupo posee una amplia experiencia de más de 15 años en la utilización del MVA habiéndose utilizado como candidato vacunal frente a patógenos como el virus de la lengua azul, el virus de la peste equina africana o el virus SARS-CoV2.**

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

- a) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?: **No**

En caso afirmativo:

- b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

- i) esporas
- ii) endosporas
- iii) quistes
- iv) esclerocios
- v) esporas asexuales (hongos)
- vi) esporas sexuales (hongos)
- vii) otros, especifíquese

- c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia: **La exposición a temperaturas iguales o mayores a 37°C, a luz ultravioleta, o a agentes químicos**



**reduce drásticamente la capacidad de supervivencia del MVA fuera de las condiciones de cultivo.**

- d) Posibles nichos ecológicos: **No aplica**
- e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: **No aplica**

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

- a) Implicaciones en procesos ambientales (*p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo*): **No aplica**
- b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos: **No aplica**

11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor: **No aplica**

12) Hábitat natural del organismo: **No aplica**

#### IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: **Virus de la Lengua azul**

Taxonomía: **perteneciente a la Familia Reoviridae, género Orbivirus**

Nombre común: **Virus de la lengua azul**

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

**Genes que codifican para las proteínas VP2, VP7, NS1 y NS2.**

3) Método de obtención:

- a) Extracción
- b) PCR
- c) Síntesis *in Vitro*

4) Función del gen/genes en el organismo donante:

**Segmento 2: Gen que codifica para la proteína VP2. Esta proteína es la responsable de la unión al receptor celular. La proteína forma trímeros y es la mayor inductora de anticuerpos neutralizantes. Además, debido a su variabilidad es la proteína que determina los serotipos del virus de la lengua azul.**



**Segmento 5: Gen que codifica para la proteína NS1. Esta proteína no es estructural y no se incorpora al virión. Durante la infección, una vez en el citoplasma de la célula, múltiples copias de NS1 se ensamblan dando lugar a estructuras tubulares, típicas de las infecciones de orbivirus. Estas estructuras se asocian también con las factorías virales, y se ha sugerido que pueden tener un papel regulador en la síntesis de proteínas virales. Es la proteína mas conservada entre serotipos del virus e inductora de una respuesta inmune celular CD8+ protectora frente al virus de la lengua azul.**

**Segmento 7. Gen que codifica para la proteína VP7. La proteína VP7 está muy conservada entre serotipos. Esta proteína juega un papel importante en la integridad estructural del core viral. VP7 puede mediar el anclaje y la entrada en células de insecto en ausencia de VP2 o VP5. Esta proteína es muy antigénica y está implicada en la inducción de respuesta inmune celular frente a BTV.**

**Segmento 8. Gen que codifica para la proteína NS2. La proteína NS2 es el principal constituyente de los cuerpos de inclusión virales que se observan en células infectadas, mayoritariamente en la proximidad del núcleo. Se ha descrito que NS2 se une al ssRNA viral e hidroliza los nucleótidos trifosfato a nucleótidos monofosfato. Además, existen evidencias bioquímicas de que la proteína NS2 puede estar asociada a las proteínas del core (VP1, VP3, VP4, VP6 y VP7). Estas observaciones son consistentes con la idea de que NS2 podría tener un papel fundamental en la selección de los segmentos de ssRNA para su incorporación a la progenie viral, antes de la encapsidación y replicación del genoma.**

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

SI  NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i) seres humanos

ii) animales

iii) plantas

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

**Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de la lengua azul varían considerablemente entre las distintas especies de hospedadores y las cepas virales. El serotipo no determina la virulencia ya que existen cepas altamente virulentas y otras más benignas dentro del mismo serotipo. Aunque BTV afecta a muchas especies de rumiantes, el cuadro clínico completo de la enfermedad aparece generalmente en la oveja. Los signos clínicos pueden ser fiebre alta durante algunos días así como congestión, descarga ocular y nasal, apatía, rigidez muscular y cojera. Se da un deterioro de la lana y del estado general del animal, además se produce una pérdida**



de peso y se reduce la producción de leche. Las lesiones típicas son edema facial, inflamación del rodete coronario (coronitis), laminitis, necrosis en músculo esquelético y cardíaco, edemas y úlceras necróticas en la mucosa oral, edema pulmonar y trombosis vascular. Además, a veces se produce cianosis de la lengua, lo que da nombre a la enfermedad de la lengua azul, pero es un signo poco común. Otro signo peculiar de la enfermedad es la aparición de hemorragias en la base de la arteria pulmonar.

c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?

**No se han descrito estos genes como factores de virulencia del virus. Además, no trabajamos con el genoma completo del virus, 10 segmentos de RNA doble cadena responsables de la virulencia.**

6) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

**No se ha descrito.**

## V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

- a) Inserción de material genético
- b) Delección de material genético
- c) Sustitución de bases
- d) Fusión celular
- e) Otros, especifíquese

2) Finalidad de la modificación genética: **Insertar los genes sintéticos VP2, VP7, NS1 y NS2 del virus de la lengua azul, producidos por la empresa GenScript, en el genoma del MVA, con la finalidad de generar una vacuna frente BTV. Se trata de un poxvirus MVA no relacionado con el orbivirus, que no replica de forma productiva ni en células humanas, ni de oveja, ni de ratón, ni en humanos, oveja, o ratón, pero que induce respuestas inmunes frente a las proteínas de BTV. En ningún momento se generarán partículas infectivas de MVA con RNA doble cadena del virus de la lengua azul.**

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

**La modificación se lleva a cabo por recombinación entre el plásmido transfectado y el genoma del virus durante su replicación en el citoplasma de células infectadas. Esta es la práctica estándar en el campo de los Poxvirus, y tiene una elevada fiabilidad. El virus Vaccinia se replica en el citoplasma de la célula infectada, que es donde se introduce el plásmido por transfección con métodos químicos (en este caso Fugene HD). En los sitios**



de replicación del DNA viral ocurre la recombinación entre el genoma del virus y las secuencias homólogas presentes en el plásmido (secuencias que llamamos “flancos” y se denotan MVA-L/ MVA-R y A27(L)/A27(R) en los esquemas). La doble recombinación en ambos flancos lleva a la inserción en el genoma de MVA de las secuencias que se encuentran entre los flancos. La introducción en el genoma del virus de la secuencia donada por el plásmido (el gen exógeno junto con el gen de vaccinia que confiere el fenotipo de placa) lleva consigo la sustitución del gen de la proteína fluorescente presente en ese locus, y por tanto la pérdida de fluorescencia.

El virus modificado genéticamente se recupera por aislamiento de placas grandes de virus en monocapas de cultivos de células. El método utilizado se describe en los siguientes artículos:

- Blasco, R. and Moss, B. (1995). Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene*. 158, 157-162
- Lorenzo, M.M., Galindo, I., and Blasco, R. (2004). Construction and Isolation of recombinant vaccinia virus using genetic markers. *Methods in Molecular Biology*, 269, 15-3
- Sánchez-Puig, J.M. and Blasco, R. (2005). Isolation of vaccinia MVA recombinants using the viral F13L gene as the selective marker. *Biotechniques* 39, 665-670
- Sanchez-Puig, J.M., Lorenzo, M.M. and Blasco, R. (2012) Isolation of recombinant MVA using F13L selection marker. *Methods Mol Biol*. 2012;890:93-111.
- Lorenzo, M.M., Sánchez-Puig, J.M. & Blasco, R. Genes A27L and F13L as Genetic Markers for the Isolation of Recombinant Vaccinia Virus. *Sci Rep* 9, 15684 (2019) doi:10.1038/s41598-019-52053-4

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

SÍ  NO

En caso afirmativo:

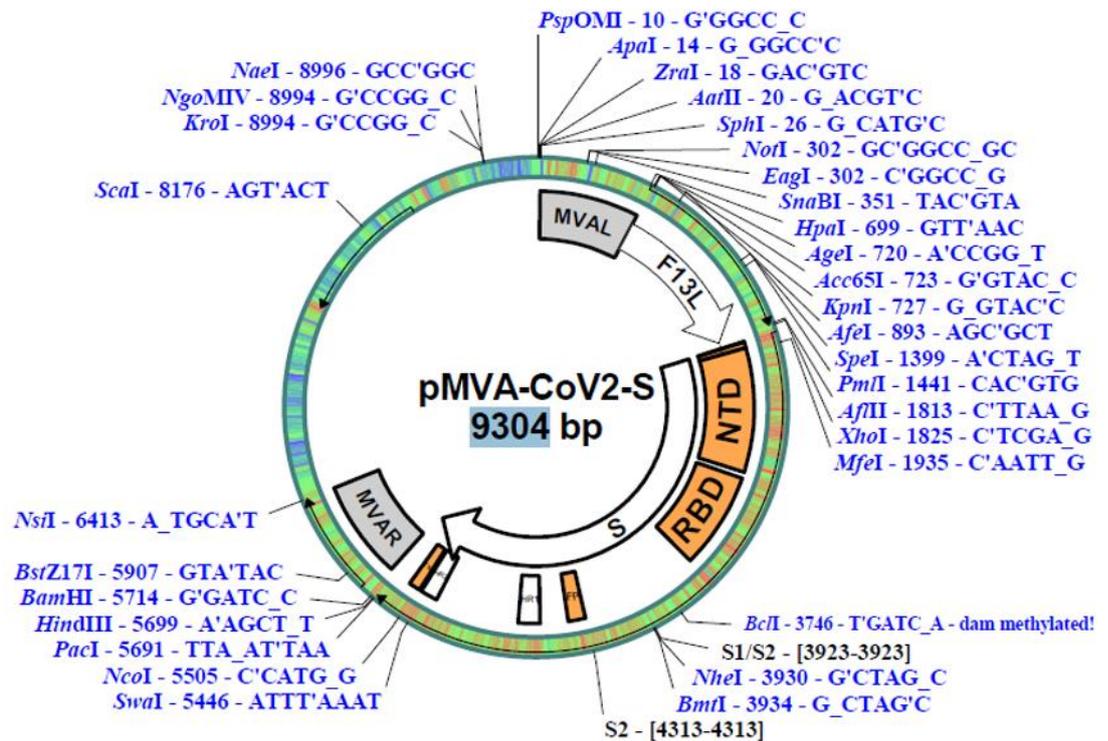
a) Tipo e identidad del vector: **Plásmido**

b) Si se trata de un virus: **No aplica**

Es defectivo en replicación SÍ  NO

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

**Plásmido para la inserción en el locus F13L:**



El vector está derivado del plásmido comercial pGEM 7Zf(-) para *E. coli*.

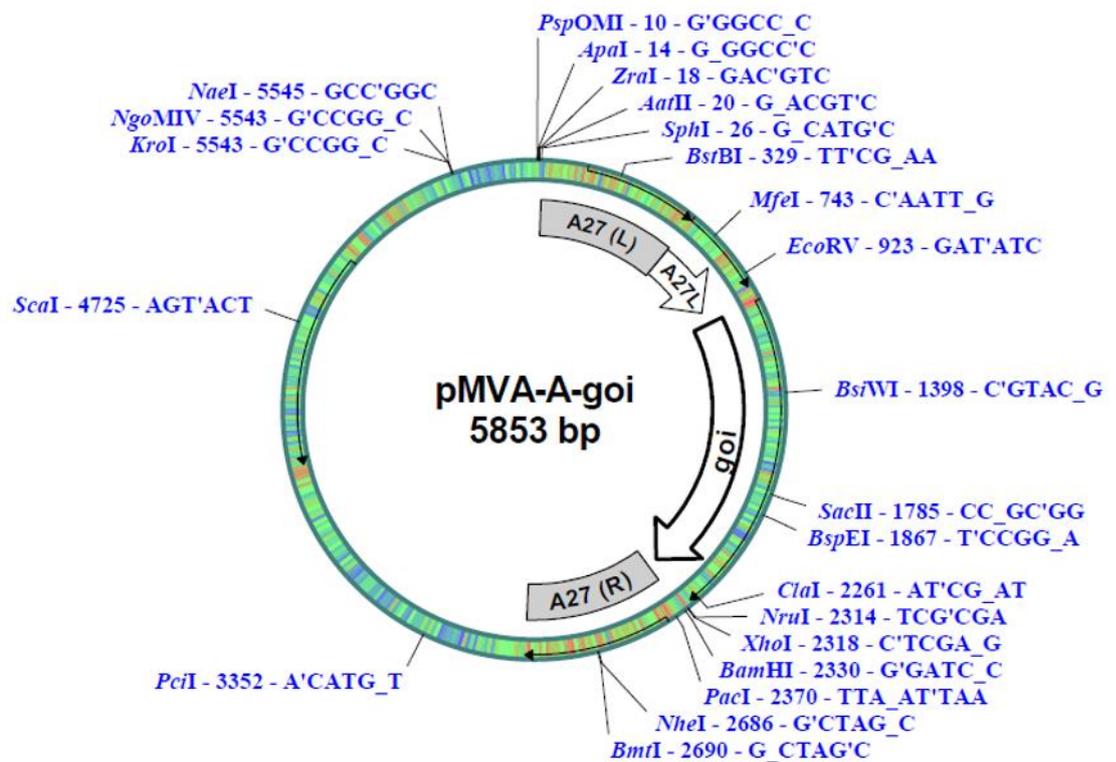
MVA-L y MVA-R corresponden a los flancos de recombinación. Son las secuencias correspondientes a la zona del genoma del virus alrededor del gen F13L que se utilizan para dirigir la inserción por recombinación homóloga.

F13L es un gen de MVA, que corresponde al gen 51.2rMVA\_047 en la secuencia del virus MVA (GenBank: MK314713.1). Lo nombramos F13L siguiendo la nomenclatura seguida habitualmente en Poxvirus, basada en la cepa Copenhagen.

Se coloca un promotor específico de Poxvirus entre el final del gen F13L y el inicio del gen foráneo para conseguir la expresión de éste. El promotor usado es un promotor sintético temprano/tardío, descrito en Chakrabarti et al. Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. *Biotechniques*. 1997 Dec;23(6):1094-7. doi:10.2144/97236st07.

En este caso el gen foráneo es el gen de la proteína VP2 de BTV.

Plásmido para la inserción en el locus A27L:



El vector también está derivado del plásmido comercial pGEM 7Zf(-) para *E. coli*.

A27(L) y A27(R) denotan las secuencias que flanquean a la zona a insertar. Son secuencias de la zona del genoma del virus alrededor del gen A27L que se utilizan para dirigir la inserción por recombinación homóloga.



**A27L es un gen de MVA, que corresponde al gen 51.2rMVA\_148 en la secuencia del virus MVA (GenBank: MK314713.1). Lo nombramos A27L siguiendo la nomenclatura seguida habitualmente en Poxvirus, basada en la cepa Copenhagen.**

**Se coloca un promotor sintético temprano/tardío entre el final del gen A27L y el inicio del gen foráneo (goi en el esquema) para conseguir la expresión de éste. El promotor usado es exactamente igual al indicado previamente en el caso del plásmido para F13L. En este caso el gen foráneo serán los genes de BTV VP7, NS1, o NS2.**

d) Gama de hospedadores del vector: **No aplica**

e) Características de la movilidad del vector: **No aplica**

i) factores de movilización

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

iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos? **El sitio de inserción en el genoma de MVA es el espacio intergénico entre los genes F13L y F12L para el locus F13L y el espacio intergénico entre los genes A27L y A26L para el locus A27L. Se inserta solamente parte del plásmido, de manera que el origen de replicación del plásmido, el gen de resistencia a Ampicilina, y demás secuencias bacterianas no se insertan.**

5) Información del inserto:

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

**Segmento 2 (VP2): Gen Bank: KP821068, ORF: 2907 bp**

**Segmento 5 (NS1): Gen Bank: KP821430, ORF: 1675 bp**

**Segmento 7 (VP7): Gen Bank: KP821672, ORF: 1050 bp**

**Segmento 8 (NS2): Gen Bank: KP821792, ORF: 1062 bp**

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

**El segmento 2 codifica para la proteína VP2. Esta proteína es la responsable de la unión al receptor celular. La proteína forma trímeros y es la mayor inductora de anticuerpos neutralizantes. El segmento 5 codifica para la proteína NS1. Esta proteína no es estructural y no se incorpora al virión. Es la proteína mas conservada entre serotipos del virus e inductora de una respuesta inmune celular CD8+ protectora frente al virus de la lengua azul. El segmento 7 codifica para la proteína VP7. La proteína VP7 está muy conservada entre serotipos, es muy antigénica y está implicada en la inducción de respuesta inmune celular frente a**



**BTV. El segmento 8. Gen que codifica para la proteína NS2. La proteína NS2 es el principal constituyente de los cuerpos de inclusión virales que se observan en células infectadas, mayoritariamente en la proximidad del núcleo. Se ha descrito que NS2 contiene eítapos T CD8+ teóricos conservados entre serotipos del virus de la lengua azul.**

- c) Descripción del método utilizado para la transformación:

**Infección/ Transfección**

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

**El segmento 2 codifica para la proteína VP2. Esta proteína es la responsable de la unión al receptor celular, forma trímeros y es la mayor inductora de anticuerpos neutralizantes. El segmento 5 codifica para la proteína NS1. Esta proteína no es estructural y no se incorpora al virión. Da lugar a estructuras tubulares, típicas de las infecciones de orbivirus y su forma soluble tiene un papel regulador en la síntesis de proteínas virales. Es la proteína mas conservada entre serotipos del virus e inductora de una respuesta inmune celular CD8+ protectora frente al virus de la lengua azul. El segmento 7 codifica para la proteína VP7, muy conservada entre serotipos. Esta proteína juega un papel importante en la integridad estructural del core viral y está implicada en la inducción de respuesta inmune celular frente a BTV. El segmento 8 codifica para la proteína NS2, principal constituyente de los cuerpos de inclusión virales que se observan en células infectadas, mayoritariamente en la proximidad del núcleo. Se ha descrito que NS2 se une al ssRNA viral e hidroliza los nucleótidos trifosfato a nucleótidos monofosfato.**

- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto: **Promotor temprano/tardío del virus vaccinia,**
- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente? **Si**
- g) ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese. **No**
- h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese. **No**



## VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? **No**

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?: **No**

En caso afirmativo:

i) número de copias:

ii) localización cromosómica:

iii) secuencias colindantes

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

c) Si se trata de un virus: **Si**

i) La inserción es específica

ii) La inserción se produce al azar

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas

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

iv) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

vi) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto.

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 hombre, 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: **No aplica**
- 3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*): **El OMG es estable en cultivos celulares tras 9 pases seriados a baja multiplicidad de infección sin pérdida de los insertos introducidos en su genoma.**
- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos: **No**
- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: **PCR, secuenciación, western blot, ELISA, técnicas de biología molecular.**
  - b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: **No aplica**

## VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

- 1) Naturaleza de las operaciones:
- a) Enseñanza
  - b) Investigación
  - c) Desarrollo
- 2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:
- a) Volumen máximo en el caso de microorganismos: **30 ml con un título viral aproximado de  $10^9$  pfu/ml.**
  - b) Número de plantas:
  - c) Número de animales: **En cada ensayo de respuesta inmune protectora se utilizarán 55 ratones IFNAR(-/-). Para analizar la protección conferida por los candidatos vacunales generados los experimentos se realizarán con 1 grupo de ratones**



placebos no vacunados y 10 grupos vacunados con diferentes combinaciones de los candidatos vacunales (5 ratones/grupo). Los ratones recibirán dos dosis de inmunógenos por vía intramuscular y espaciadas por 4 semanas. A día 0 recibirán una primera dosis y a día 22 una segunda dosis ( $1-2 \times 10^7$  PFU/ratón en un volumen de 50  $\mu$ l, por vía intramuscular). Cada grupo se distribuirá en dos jaulas (5 para analizar los signos clínicos de la enfermedad y 5 para toma de muestras). Posteriormente, los ratones se inocularán con una dosis subcutánea de 100 pfu de BTV en 100  $\mu$ l de DMEM.

Los ensayos de respuesta inmune protectora en oveja se utilizarán 30 animales. Se realizarán con 1 grupo de ovejas placebo no vacunadas y 5 grupos vacunados con diferentes combinaciones de los candidatos vacunales (5 ovejas/grupo). Los animales recibirán dos dosis de inmunógenos por vía intramuscular y espaciadas por 4 semanas. A día 0 recibirán una primera dosis y a día 28 una segunda dosis ( $10^8$  PFU/oveja en un volumen de 1ml, por vía intramuscular). Posteriormente, los animales se inocularán con una dosis subcutánea de  $10^8$  PFU/oveja de BTV en 1ml de DMEM.

- 3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

**5 años**

*(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 asociadas las actividades con los OMG).*

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

**Generación de una vacuna frente al virus de la lengua azul basada en las proteínas VP2, VP7, NS1 y NS2 y estudio de su capacidad inmunogénica y de protección en ratones IFNAR(-/-) y ovejas.**

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

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

- 6) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo



en virtud de la legislación aplicable<sup>2</sup> (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*):

**El tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación y etiquetado seguirán la legislación internacional y nacional vigente para el transporte de material biológico infeccioso para humanos y animales.**

- 7) Descripción de los métodos de manejo de los OMG (*incluyendo descripción de las fases de cultivo y concentración máxima de OMG en el cultivo*):

**Una vez obtenidos los OMGs mediante ingeniería genética se amplifican en células DF-1**

**sembradas en p150 (10) y se purifican mediante procesos de centrifugación, congelación, descongelación, mediante gradientes de cloruro de cesio si se considera necesario y se almacenan a -80°C. Los títulos alcanzados están en torno a 10<sup>9</sup> partículas infectivas.**

**Ensayos de protección con modelos animales:**

**Para los estudios de protección de los candidatos vacunales se utilizará primero el modelo animal de ratón IFNAR(-/-) (Knockout IFN $\alpha$ / $\beta$ R-/- (A129) procedentes de laboratorios MARSHALL BIORESOURCES (<https://www.marshallbio.com/mice>)), que no expresan el gen del receptor de interferón IFN $\alpha$ / $\beta$  (Tipo I).**

**Los ensayos de patogenicidad y protección con ratones IFNAR(-/-) se realizarán en un Box de nivel 3 de bioseguridad.**

**CISA-INIA (Valdeolmos, Madrid) adaptado para el trabajo con el virus de la lengua azul. Este box está equipado con una cabina de flujo laminar de clase IIA/B3.**

## **REFERENCIAS**

- 1. Ortego J, de la Poza F, Marín-López A. (2014) Interferon  $\alpha$ / $\beta$  receptor knockout mice as a model to study bluetongue virus infection. *Virus Res.* 2014 Mar;182:35-42. doi: 10.1016/j.virusres.2013.09.038. Epub 2013 Oct 4.**
- 2. Marín-López A, Bermúdez R, Calvo-Pinilla E, Moreno S, Brun A, Ortego J. (2016) Pathological Characterization Of IFNAR(-/-) Mice Infected With Bluetongue Virus**

---

<sup>2</sup> 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.
- **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/>



**Serotype 4. Int J Biol Sci. 2016 Nov 24;12(12):1448-1460. doi: 10.7150/ijbs.14967. eCollection 2016.**

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

**La zona de contención biológica de 10.824 m<sup>2</sup>, 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 al 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 mas 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  $\mu\text{m}$ -0.20  $\mu\text{m}$ ). 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 m<sup>3</sup> 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.**

**- Para el control y tratamiento de sólidos biocontaminados existe un horno crematorio pirolítico, diferentes autoclaves de vapor y la presencia de sistemas de descontaminación química (SAS o Airlocks) a base de peróxido de hidrógeno gas o mediante ducha química superficial**

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

**• 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 a 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 situaciones de riesgo adicional que podría suponer a aquellos trabajadores especialmente sensibles (patologías previas, trastornos inmunitarios, embarazo, lactancia, discapacidad, etc.).**



- El uso de ropa de trabajo especial como pijamas, camisetas, monos, ropa interior, zuecos o zapatillas, botas, etc.

- El cambio de ropa en los accesos y salidas a la zona de alta seguridad.

De igual manera y en cumplimiento de la legislación vigente, los trabajadores que vayan a desarrollar cualquier actividad en el 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 entendiendo 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 (se adjunta formato).

El box de experimentación donde se va a desarrollar las actividades con OMGs del virus de la lengua azul, 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  $10^6$

- Equipo de 8 personas de técnicos especializados de seguridad biológica.

## VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El CISA está ubicado a 700 m de la localidad de Valdeolmos que presenta una baja densidad de población (< 1.000 habitantes). No existen próximos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza. El riesgo de contaminación en dependencias cercanas



a la instalación o en el medio ambiente externo al CISA es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

- El laboratorio está equipado con medios e infraestructura de biocontención superiores a los establecidos para las operaciones confinadas de Tipo 3, en la legislación de aplicación y normativas nacionales e internacionales.

- La Instalación se encuentra validada por empresa externa, inspeccionada y declara como nivel 3 de contención biológica por el Instituto Regional de Seguridad y Salud en el Trabajo de la CAM, auditada interna y externamente en riesgo biológico por empresas ajenas, cualificada anualmente por empresa especializadas en CSB y filtración y verificada por el equipo propio de seguridad biológica periódicamente de forma rutinaria y frente a operaciones de mantenimiento correctivo.

- Se dispone de procedimientos de bioseguridad por actividades tales como, investigadores, animalario, seguridad biológica, mantenimiento, limpieza, vigilancia perimetral y equipo médico, donde se especifican las normas de bioseguridad para descontaminaciones, gestión de residuos, operaciones de mantenimiento correctivo, envíos y recepción de muestras, transporte interior, uso de airlocks y SAS, etc.

- Se dispone de un programa mensual, bimestral, trimestral, cuatrimestral semestral y anual de actuaciones de verificación y seguimiento de instalaciones críticas.

- Se dispone de documentos de control de acciones, trabajos y seguimiento de parámetros de bioseguridad.

- Se dispone de estación informática de control y seguimiento de parámetros esenciales de bioseguridad e infraestructura de mantenimiento redundante (interior NCB3-exterior).

- Se dispone de estación informática de seguimiento de parámetros para tratamiento de efluentes redundante (interior NCB3 y exterior).

- Se dispone de redundancia en suministro eléctrico con dos líneas de alta tensión, dos transformadores de baja autoconmutados, dos grupos electrógenos y dos UPS /SAI.

- Todas las operaciones de mantenimiento preventivo se encuentran verificadas.

- Se realiza tratamiento de residuos “in situ”.

- La instalación dispone de un plan de emergencias de actuación en caso de accidente biológico y plan de evacuación sobre incidentes en incendios, aviso de bomba, accidente biológico químico y evacuación de accidentados.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

**Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos. Con fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.**



- 3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista:

**Las operaciones indicadas se desarrollaran en un box de experimentación en contención biológica de nivel 3 (NCB3).**

**Toda la Instalación se encuentra autorizada para trabajos con OMG Tipo 3 (A/ES/00/I-1) con fecha de Resolución de 5 de diciembre de 2000 por la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental; Subdirección General de Impacto Ambiental y Prevención de Riesgos; Secretaría General del Ministerio de Medio Ambiente (nº registro salida 8443).**

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

- 1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

**Las normas básicas de bioseguridad seguir son las recogidas en el Manual de Bioseguridad para trabajos en el animalario con virus de la lengua azul y Manual de Procedimientos Generales de Bioseguridad para trabajos con virus de la lengua azul.**

**El personal tiene experiencia en trabajos en box NCB3 y técnicas de laboratorio con la infraestructura específica.**

- 2) Formación del personal adscrito:

**El personal actuante ha sido formado antes de iniciar la actividad mediante un curso teórico práctico sobre Bioseguridad en contención 3 en el laboratorio y Animalario específico.**

**Fueron sometidos a test de comprensión.**

**El personal recibe un cursos de reciclaje en bioseguridad anualmente.**

- 3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

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

- 4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

**Llevado a cabo por personal especializado en mantenimiento 24horas / 365 días año.**

- 5) Programas de inspección y control del confinamiento:

**Llevado a cabo por técnicos especializados en Seguridad Biológica.**





- 3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

**Manual de bioseguridad para animalario "lengua azul".**

**Plan de Evacuación**

**Procedimientos de Bioseguridad específicos para el virus de la lengua azul en animalario**

- 4) Planes de emergencia:

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



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

Nº de Notificación:

**I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD**

- 1) Entidad  
Nombre: **Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA); Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA); Ministerio de Ciencia e Innovación**  
Dirección postal: **Carretera de Algete a El Casar de Talamanca s/n; Valdeolmos - Alapardo; 28130 Madrid**
- 2) Representante legal de la entidad  
Nombre y apellidos: **Esther Esteban Rodrigo**  
NIF: **05271582M**  
Cargo: **Directora del INIA**  
Tel:  
Fax:  
Correo electrónico: **esther.esteban@inia.es**
- 3) Responsable científico de la actividad  
Nombre y apellidos: **Francisco Javier Ortego Alonso**  
NIF: **50165853R**  
Cargo: **Científico Titular de OPIs**  
Tel: **91 6202300**  
Fax: **91 6202247**  
Correo electrónico: **ortego@inia.es**
- 4) 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**  
Fax: **91 6202247**  
Correo electrónico: **laura.perez@inia.es**
- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: **Laura Pérez Palancar**

**II.**



## II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

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

### 1) Objetivo de la actividad:

**Desarrollo de virus vaccinia MVA recombinantes que expresen distintas proteínas del virus de la lengua azul (BTV), que van a ser testados posteriormente como candidatos vacunales. El objetivo de la actividad es analizar la respuesta inmune protectora de vacunas basadas en virus vaccinia modificado Ankara (MVA) recombinantes que expresen distintas proteínas del virus de la lengua azul (BTV) frente a la infección con distintos serotipos del virus. Para ello se realizarán ensayos de patogenicidad y protección en ratones susceptibles a la infección viral que mimetizan la enfermedad severa observada en ovejas así como en ovejas, huésped natural del virus. Estos ratones susceptibles están modificados genéticamente para no expresar el gen que codifica el receptor humano de interferón tipo I. La eficacia de los candidatos vacunales o antivirales se determinará en este modelo animal murino IFNAR(-/-) y en ovejas. Para conseguir estos objetivos, el único modelo experimental que se puede utilizar son animales.**

**El modelo animal consiste en ratones Knockout IFN $\alpha$ / $\beta$ R-/- (A129) procedentes de laboratorios MARSHALL BIORESOURCES (<https://www.marshallbio.com/mice>), que no expresan el gen del receptor de interferón IFN $\alpha$ / $\beta$  (Tipo I).**

**Para los ensayos de inmunogenicidad y protección se usarán virus MVA recombinantes que expresan las proteínas de BTV. Se realizarán protocolos utilizando una sola dosis o dos dosis de los candidatos vacunales espaciadas 4 semanas. La construcción de los virus MVA recombinantes utilizados como candidatos vacunales frente a BTV, se realizarán en las 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) Duración prevista de la actividad:

**Se prevé un periodo de cinco años desde la recepción de la autorización de la actividad 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).*

## III. EVALUACIÓN DE RIESGO

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



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

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

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

a) Organismo receptor.

**Virus vaccinia, virus de la vacuna cepa MVA. Es un virus altamente atenuado procedente de la cepa Ankara que ha sido ensayado en humanos demostrándose su inocuidad, sin efectos alérgicos o tóxicos. No produce propiedades nocivas.**

b) Organismo donante.

**Virus de la lengua azul (BTV), perteneciente a la familia Reoviridae, género orbivirus. Los genes sintéticos se han producido por la empresa GenScript. Estas secuencias no presentan ningún tipo de homología con el proteoma humano, ni tampoco inducen patogenicidad y/o virulencia. No hay posibles efectos alérgicos y/o tóxicos.**

c) Inserto.

**-Segmento 2 (VP2): Gen Bank: KP821068, ORF: 2907 bp  
Segmento 5 (NS1): Gen Bank: KP821430, ORF: 1675 bp  
Segmento 7 (VP7): Gen Bank: KP821672, ORF: 1050 bp  
Segmento 8 (NS2): Gen Bank: KP821792, ORF: 1062 bp**

d) Vector.

**Los vectores plasmídicos pMVA utilizados para insertar los genes sintéticos no producen ninguna propiedad nociva.**

e) Organismo modificado genéticamente resultante.

**Los virus recombinantes MVA-BTV generados no producen propiedades nocivas.**

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

**Los OMG generados [virus recombinantes MVA-BTV] no producen efectos nocivos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.**

g) Efectos para el medio ambiente.

**Los OMG generados [virus recombinantes MVA-BTV] no producen efectos nocivos para el medio ambiente.**

2) Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:



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

- Tipo 1
- Tipo 2
- Tipo 3
- Tipo 4

**La generación de los OMG [virus recombinantes MVA-BTV] y los estudios “in vivo” en los que se va a utilizar el virus BTV se realizarán en un Grado de Confinamiento Tipo 3 .**

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

a) Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental).

**La actividad se va a llevar a cabo en un laboratorio y un box de experimentación animal del CISA-INIA-CSIC, instalación con nivel de bioseguridad tipo 3. El OMG estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo.**

**Los animales de experimentación se ubicarán en un box con nivel de bioseguridad tipo 3.**

**Toda la actividad con animales se situará y desarrollará dentro de un box NCB3 que presenta:**

- Ubicación en espacio NCB3,
- Acceso al animalario independiente a través de “prerom” de doble puerta con apertura por huella.
- Puertas de acceso a área de box estancas por junta activa (neumáticas),
- Vestuario interior por box limpio –sucio
- Ducha de descontaminación exclusiva por arrastre y dilución (agua)
- Puertas secundarias de acceso a espacio de box estancas por junta estática,
- Cámaras de vigilancia en box y ojo de buey para vigilancia presencial,
- Presión negativa en 30 Pa mínimo respecto a pasillo de animalario y de 45Pa de este respecto a exterior,
- Doble filtración HEPA en aire de extracción,
- Valvulería automática “airtigh” en impulsión,



- Drenajes con conexión directa a líneas de tratamiento de efluentes por sistema termoquímico validado física y microbiológicamente con carácter anual y microbiológicamente con carácter trimestral,

- Seguimiento de parámetros de biocontención de la Instalación NCB3 por control

informático duplicado (interior-exterior), dotado de sistemas de alarma con comunicación por in situ y por e-mail,

- suministro eléctrico triple (dos líneas de alta tensión, dos centros de transformación (alta-media), dos grupos electrógenos, dos UPS/SAI,

- Presencia de personal de mantenimiento correctivo, preventivo y predictivo, 24 horas/día; 365 días /año.

El riesgo de exposición es muy bajo al disponer de rack ventilado para el aislamiento de ratones y Cabina de Seguridad Biológica Clase II A para toma de muestras y manipulación de animales.

La cabina se validará “in situ” anualmente por empresa ajena y se verifica por personal propio de seguridad biológica.

**No hay riesgo de contagio por contacto**

El riesgo de contaminación indoor out door por estas razones 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 cursos 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.

b) Concentración y escala utilizadas.

Se utilizarán en los distintos ensayos aproximadamente 30 ml de los OMG a una concentración de  $10^9$  pfu/ml.



En cada ensayo de respuesta inmune protectora se utilizarán 55 ratones IFNAR(-/-). Para analizar la protección conferida por los candidatos vacunales generados los experimentos se realizarán con 1 grupo de ratones placebos no vacunados y 10 grupos vacunados con diferentes combinaciones de los candidatos vacunales (5 ratones/grupo). Los ratones recibirán dos dosis de inmunógenos por vía intramuscular y espaciadas por 4 semanas. A día 0 recibirán una primera dosis y a día 22 una segunda dosis (1-2 x 10<sup>7</sup> PFU/ratón en un volumen de 50 µl, por vía intramuscular). Cada grupo se distribuirá en dos jaulas (5 para analizar los signos clínicos de la enfermedad y 5 para toma de muestras). Posteriormente, los ratones se inocularán con una dosis subcutánea de 100 pfu de BTV en 100 µl de DMEM.

Los ensayos de respuesta inmune protectora en oveja se utilizarán 30 animales. Se realizarán con 1 grupo de ovejas placebo no vacunadas y 5 grupos vacunados con diferentes combinaciones de los candidatos vacunales (5 ovejas/grupo). Los animales recibirán dos dosis de inmunógenos por vía intramuscular y espaciadas por 4 semanas. A día 0 recibirán una primera dosis y a día 28 una segunda dosis (108 PFU/oveja en un volumen de 1ml, por vía intramuscular). Posteriormente, los animales se inocularán con una dosis subcutánea de 108 PFU/oveja de BTV en 1ml de DMEM.

- c) Condiciones de cultivo (se tendrá en cuenta el entorno potencialmente expuesto, la presencia de especies susceptibles, supervivencia del OMG y efectos sobre el entorno físico).

El virus se maneja utilizando la infraestructura de contención del laboratorio NCB3. Se realizan infecciones en líneas celulares permisivas (DF-1). 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 (Gómez et al., Vaccine, 25(15):2863-85, 2007). Todos los procesos de manipulación se llevarán a cabo en cabina de bioseguridad y usando equipos de protección individual (bata, mascarilla y guantes). Los residuos biosanitarios líquidos se inactivarán con lejía durante 30 minutos. Los residuos biosanitarios sólidos serán posteriormente autoclavados y retirados por una empresa autorizada.

La utilización de animales (ratones y ovejas) supondría un riesgo limitado. Consideramos que el riesgo real es poco probable, casi desdeñable, dadas las estrictas medidas de contención en las que se realiza la actividad dentro de la instalación CISA-INIA-CSIC, que impedirían la liberación estos animales al medio ambiente.

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

**Actividad confinada de Tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.**



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

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

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

**El Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) se encuentra ubicado a 700 metros de la localidad de Valdeolmos.**

**Valdeolmos presenta una densidad de población escasa (< 1000 habitantes). Se asienta en una penillanura a una altitud de 685 m sobre el nivel del mar.**

**Se encuentra rodeado de tierras de cultivo de secano (trigo, centeno, avena) y no dispone cercana, ninguna explotación ganadera. Es zona CEPA.**

**Presenta un conjunto de Instalaciones reunidas en un solo edificio subdividido en área administrativa, zona NCB2 y zona NCB3.**

**Actualmente trabajan alrededor de 170 personas en las diferentes áreas.**

- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

**Indicadas en el Plan de emergencias y evacuación.**

- c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.

**Explicados anteriormente y desarrollados en el Plan de emergencias y evacuación y en la parte A (anexo de documentación correspondiente a la solicitud)**

- d) Planes de emergencia.

**El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud.**