



**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 BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CSIC-UAM)

Dirección postal: C/ NICOLAS CABRERA 1, 28049 MADRID

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: LOURDES RUIZ DESVIAT

NIF: 05253811J

Cargo: DIRECTORA

Tel: 911964424

Fax:

Correo electrónico: direccion@cbm.csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Yolanda Revilla Novella

NIF:02848201L

Cargo: Jefe de Grupo. Investigadora Científica CSIC

[Tel:911964570](tel:911964570)

Fax:

Correo electrónico: yrevilla@cbm.csic.es

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

Nombre y apellidos: GEMA CAPARRÓS DE LA JARA

NIF: 05432793D

Cargo: RESPONSABLE DE BIOSEGURIDAD

Tel: 911964537

Fax:

Correo electrónico: gcaparros@cbm.csic.es

e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: Yolanda Revilla y Gema Caparrós

2) Debe señalarse si para la ejecución de esta actividad se recibe financiación del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica. Esta información es



necesaria para determinar si la actividad se encuentra dentro del supuesto del artículo 3.2.b) de la Ley 9/2003 y, por lo tanto, la competencia recae en la Administración General del Estado.

SI NO

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

-Nombre de la convocatoria: Convocatoria 2020 Proyectos de I+D+i - RTI Tipo B

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: PID2020-117300RB-I00. IP, Yolanda Revilla Novella

-Organismo financiador: Ministerio de Ciencia e Innovación

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

a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación: Cultivos 27/07/2017

b) Número de referencia del expediente: Cultivos A/ES/17/I-22

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad: Mecanismos de atenuación molecular y genética del VPPA. Desarrollo de candidatos delecionados en genes virales relacionados con la virulencia, que resulten atenuados, para la posterior construcción de vacunas LAVs (vacunas vivas atenuadas), la única opción realista de vacunas frente a este virus ANIMAL, que en este momento supone la mayor pandemia mundial de animales para el consumo humano.

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

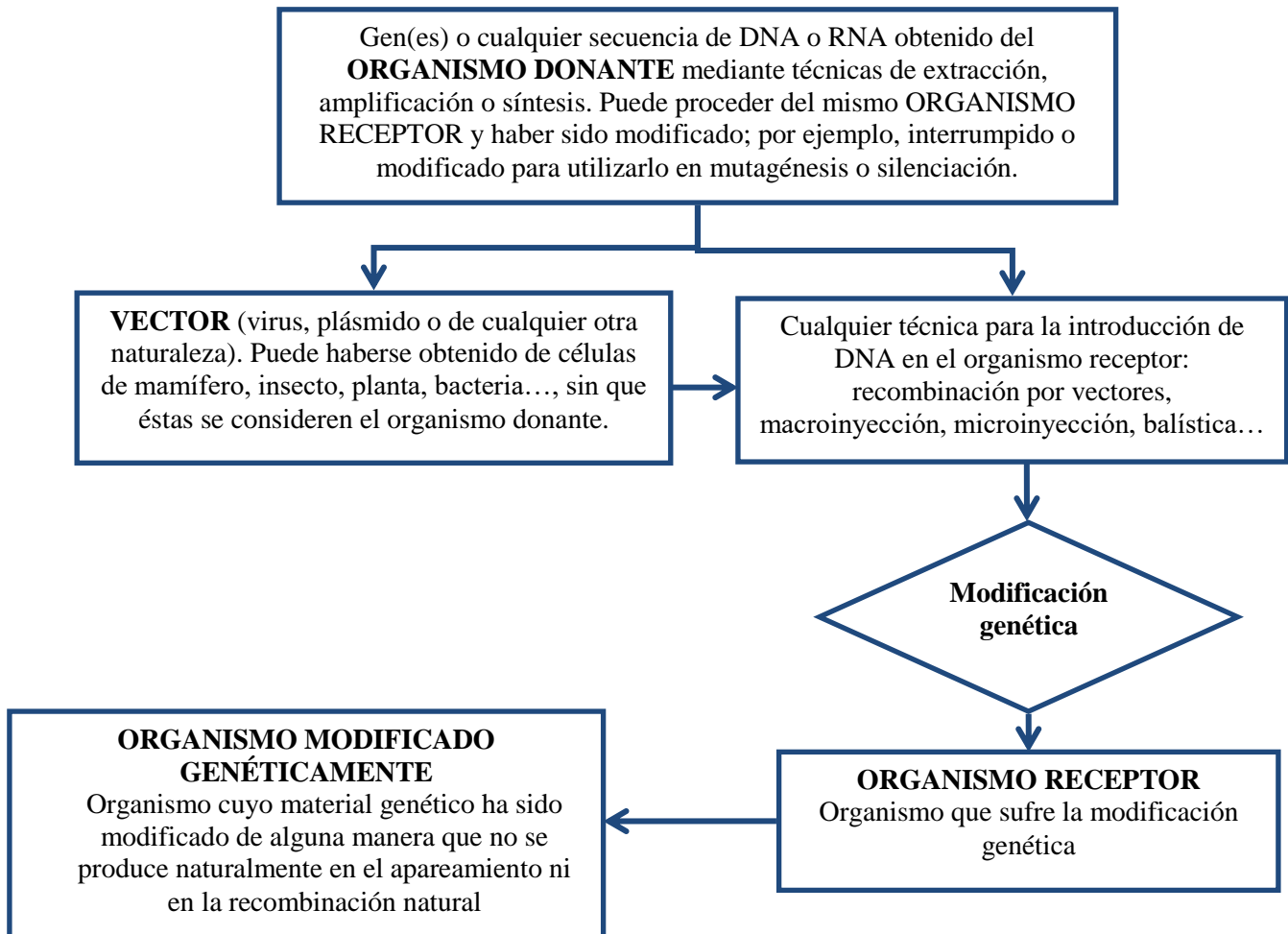
Tipo 4

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.



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: VPPA Arm/07/cbm/c2. Este virus NO es un organismo modificado genéticamente. Se trata de una variante natural contenida dentro del stock natural del virus Armenia/07, sin modificaciones genéticas y cuya homología de secuencia con el parental Armenia/07 es 99,95%.

Taxonomía: ASFARVIRIDAE

Nombre común: VPPA

- 2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.
- a) Técnicas de aislamiento: Aislamiento en macrófagos porcinos y/o en células COS
 - b) Técnicas de identificación: PCR (amplificación genes específicos del virus), serología con MoAbs específicos e identificación por secuencia del ADN.
 - c) Marcadores genéticos: A204L, DP402R, A117L
 - d) Marcadores fenotípicos: Virulencia/hemadsorción, atenuación.
 - e) Estabilidad genética: Estable tras 20 pases en células
- 3) Posibles modificaciones genéticas anteriores: NO
- 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: La VPPA afecta exclusivamente a los miembros de la familia de los suinos. Las especies que pueden infectarse incluyen al cerdo doméstico y jabalí europeo.
- 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.*):

NO, el organismo receptor no es patógeno para los seres humanos. Y nunca, desde que el virus se describió en África en 1929, se ha reportado infección en los seres humanos.

- a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad? En cerdos, el virus es el causante de la enfermedad de la peste porcina africana. Según la virulencia de las cepas del organismo receptor, el VPPA, la patogenicidad se demuestra en forma de síntomas atenuados



(hinchazón de articulaciones, pérdida de apetito), o de forma exacerbada de estos síntomas, casando la muerte de los animales.

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

SI NO

Porqué: Los virus que se atenúan en su interacción prolongada con los huéspedes, modifican de forma natural gran parte de su genoma, y dan lugar a las cepas no virulentas, de modo que nunca se ha descrito que haya reversión de estos virus no virulentos hacia la virulencia.

- 7) La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes? SI
- 8) Experiencia adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor: El grupo que solicita el permiso proviene del histórico grupo del Dr. Eladio Viñuela, precursor de la biología y la virología molecular en España y cofundador del CBMSO, de modo que la experiencia que la responsable de dicho grupo y otros componentes del mismo tienen una experiencia de más de 20 años en el estudio del organismo receptor. En ningún momento han ocurrido accidentes que afecten a la seguridad en el manejo de dicho organismo receptor. Este organismo receptor es el VPPA.
- 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: Calor, sequedad
- d) Posibles nichos ecológicos: CERDO, JABALÍ, Garrapata género Ornithodoros



- e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: No se genera en ecosistemas por sí mismo. En material contaminado, como carcasas de animales infectados, embutidos y preparados de cerdo infectado, puede permanecer más de un mes.

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:

Sudeste Asiático, China, Rusia, Polonia, Estonia, Letonia, Lituania, Hungría, Rumanía.

12) Hábitat natural del organismo: CERDO, JABALÍ, Garrapata género *Ornithodoros*

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: *Aequorea victoria* / *Discosoma mare*.

Taxonomía: Hydroida. Anemonae

Nombre común: Medusa bioluminescente / Anémona

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: genes

3) Método de obtención:

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

4) Función del gen/genes en el organismo donante: Bioluminescencia (GFP). Cromóforo (mCherry).

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

SI NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

- i) seres humanos
- ii) animales



- iii) plantas
 - b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?
 - c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?
- 6) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural? NO

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

- 1) Tipo de modificación genética:
 - a) Inserción de material genético
 - b) Deleción de material genético
 - c) Sustitución de bases
 - d) Fusión celular
 - e) Otros, especifíquese
- 2) Finalidad de la modificación genética: Substitución de genes del VPPA que producen virulencia para ser intercambiados por genes de los organismos donantes, que actúan como marcadores genéticos. La deleción específica de los genes del VPPA permite la atenuación de la virulencia. En el punto 5 de este apartado se describe con mayor detalle porqué hemos elegido los genes CD2 y A238L para eliminarlos del genoma del organismo receptor, y porqué pensamos que están relacionados con la virulencia.

Así mismo, la finalidad última de esta modificación sería obtener, a partir del organismo receptor, el ya explicado VPPA Armenia/07/cbm/2, que es una cepa natural virulenta que está circulando por todo el mundo, un virus atenuado que pudiera funcionar como una vacuna viva atenuada (LAV) frente al VPPA. Con ello pretendemos impactar en el campo científico del VPPA, contribuyendo a la generación de dicha vacuna que aliviase los problemas económicos y medioambientales de este sector ganadero, fundamental en nuestra economía. España es el tercer exportador mundial de producto derivado del ganado porcino.
- 3) Método utilizado para llevar a cabo la modificación genética: Recombinación homóloga y CRISP/cas-9, como se describe en el apartado 4 a) y 5.



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

SÍ NO

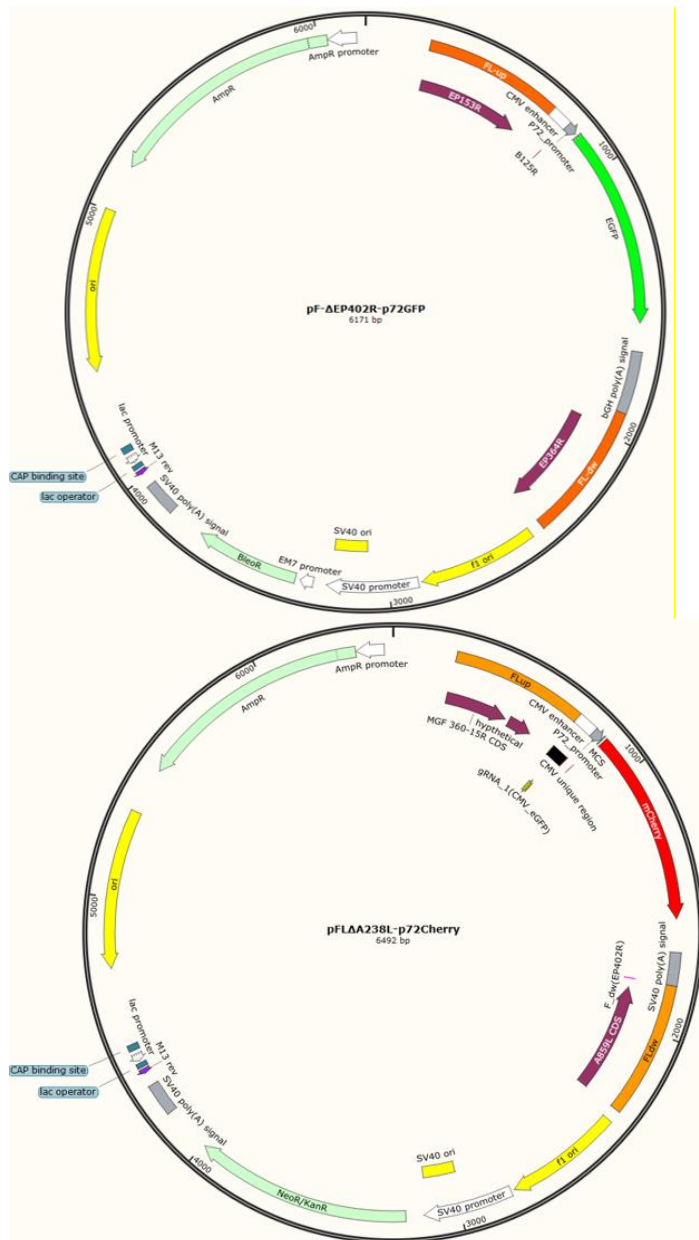
En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector: Se usan dos tipos de vectores (i) uno derivado de pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459), y (ii) un vector derivado de pcDNA3.1 que contiene las secuencias flanqueantes de los genes diana virales, (EP402R(CD2) o A238L), rodeando al marcador GFP, derivado del vector pEGFP-E3 o alternativamente, el gen mCherry derivado del vector pmCherry-N1. Es relevante decir que el vector (i) se utiliza en una técnica, CRISPR/Cas-9, que permite inducir “nicks” en los sitios precisos del ADN del organismo receptor donde se quieren insertar las secuencias que permitirán la recombinación y así se incrementa la posibilidad de generar los virus recombinantes (OMGs). Sin dicha técnica, es también posible generar por recombinación homóloga simple, los OMGs deseados, si bien en menor porcentaje.

b) Si se trata de un virus:

Es defectivo en replicación SÍ NO

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



d) Gama de hospedadores del vector: Células eucarióticas.

e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización NO

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

iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos? NO

5) Información del inserto:



- a) Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia: 6171bp, y 6492 bp, Adjunto en mapa plásmidos
- b) Origen y función específica de cada parte del inserto: En mapa.
- c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Los vectores cuyos mapas se adjuntan, se transfectan en células COS-1, que posteriormente se infectan con el organismo receptor, es decir el VPPA “wild type”. Por recombinación homóloga, y alternativamente CRISPR/Cas-9, se consigue que secuencias flanqueantes presentes en los vectores de los genes virales a delecionar (presentes en el plásmido que se transfecta), recombinen con las secuencias homólogas en el genoma del VPPA (receptor). De esta manera, se sustituyen los genes marcadores GFP o Cherry, respectivamente, por los genes del virus A238L o CD2v (402R). Se han elegido estos genes del organismo receptor, en primer lugar, porque hemos determinado sus funciones a lo largo de varios años de estudio, como se especifica en las REFS (1-5) que se adjuntan al final de este documento. Brevemente, se sabe que el CD2v codifica para una proteína que media la hemadsorción, una característica del VPPA que permite a las partículas virales y a las células infectadas unirse a los eritrocitos del huésped, lo cual se ha relacionado con la virulencia, ya que sólo los virus virulentos hemadsorben. Además, dicha proteína interfiere con el tráfico celular en la célula infectada, de modo que el virus puede causar alteraciones funcionales a este nivel.

Por su lado, el gen A238L es un inhibidor viral de factores de transcripción, NFkB y NFAT, que median la síntesis de mediadores proinflamatorios, como COX-2, iNOS, TNF alfa y otros, por lo que creemos que puede jugar un papel en la modulación de la respuesta inmune en animales. Como el objetivo fundamental que pretendemos con la generación de éstos OMGs es que sirvan como vacunas vivas atenuadas frente a la pandemia animal más importante es éstos momentos a nivel mundial, creemos que en su ausencia el huésped tendrá posibilidad de responder a la infección.

- d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto: GFP, mCherry. Ambos son dos genes marcadores para poder seleccionar el OMG, y sustituyen a los genes que se pretenden eliminar del organismo receptor. Proceden de organismos marinos en su forma natural.
- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:

Consisten en dos promotores de expresión eucariótica, el promotor de la beta actina de pollo, un promotor que da lugar a expresión muy potente del gen que regula y el pCMV, además de un promotor viral fuerte, el pp72, del VPPA.

- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

SI. Se ha secuenciado por NGS.



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

NO, se requiere el gen completo para desarrollar su función.

h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida?

NO. Las secuencias insertadas están perfectamente tipificadas, corresponden a proteínas que provienen de esponja (GFP) y anémona (Cherry) y no contienen secuencias con funciones desconocidas.

En caso afirmativo, especifíquese.



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido: VPPA deletado en CD2/A238L, expresando los genes exógenos GFP/Cherry en sustitución de los genes deletados.

a) ¿Es un plásmido libre? NO

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

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

En caso afirmativo:

i) número de copias:

ii) localización cromosómica:

iii) secuencias colindantes

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

c) Si se trata de un virus:

i) La inserción es específica SI

ii) La inserción se produce al azar NO

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas SI

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

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

v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA) SI

vi) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas) SI

REFERENCIA: Article bajo revision (2022).

Recombinant African swine fever virus Arm/07/CBM/c2 lack-ing CD2v and A238L is attenuated and fully protects pigs against virulent Korean Paju strain

Daniel Pérez-Núñez 1 †, Sun-Young Sunwoo 2 †, Raquel García-Belmonte 1, Chansong Kim 2, Gonzalo Vigara-Astillero 1, Elena Riera 1, Daemin Kim 3, Jiyun



Jeong 2, Dongseop Tark 3, Young-Seung Ko 3, Young-Kook You 2 and Yolanda Revilla 1,*

Microbes in Health and Welfare Department, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, c/Nicolás Cabrera, Madrid, Spain;

Vaccines, in press.

- 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: En animales, ATENUADO
 - d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese: NO, ATENUADO
 - e) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese: NO
 - f) Marcadores específicos del OMG: GFP, mCherry
- 3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*): Estable tras más de 20 pases en células.
- 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: Placas de lisis de color verde y/o rojas
 - b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: Picar placas de lisis positivas usando microscopio de fluorescencia

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- The viral protein A238L inhibits cyclooxygenase-2 expression through a nuclear factor of activated T cell-dependent transactivation pathway. Aitor G Granja , Maria L Nogal, Carolina Hurtado,



Virginia Vila, Angel L Carrascosa, María L Salas, Manuel Fresno, Yolanda Revilla. J. Biol Chem. 2004 Dec 17;279(51):53736-46. doi: 10.1074/jbc.M406620200. Epub 2004 Oct 7.

- 2- The viral protein A238L inhibits TNF-alpha expression through a CBP/p300 transcriptional coactivators pathway. Granja AG, Nogal ML, Hurtado C, Del Aguila C, Carrascosa AL, Salas ML, Fresno M, Revilla Y. J Immunol. 2006 Jan 1;176(1):451-62. doi: 10.4049/jimmunol.176.1.451. PMID: 16365438
- 3- Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by viral A238L-mediated inhibition of p65/RelA acetylation and p300 transactivation. Granja AG, Sabina P, Salas ML, Fresno M, Revilla Y. J Virol. 2006 Nov;80(21):10487-96. doi: 10.1128/JVI.00862-06. PMID: 17041221
- 4- Cytokine mRNA expression and pathological findings in pigs inoculated with African swine fever virus (E-70) deleted on A238L. Salguero FJ, Gil S, Revilla Y, Gallardo C, Arias M, Martins C. Vet Immunol Immunopathol. 2008 Jul 15;124(1-2):107-19. doi: 10.1016/j.vetimm.2008.02.012. Epub
- 5- CD2v Interacts with Adaptor Protein AP-1 during African Swine Fever Infection. Pérez-Núñez D, García-Urdiales E, Martínez-Bonet M, Nogal ML, Barroso S, Revilla Y, Madrid R. PLoS One. 2015 Apr 27;10(4):e0123714. doi: 10.1371/journal.pone.0123714. eCollection 2015. PMID: 25915900

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: Las operaciones de infectar células, producir virus recombinantes, titular dichos virus, purificar DNA de para NGS, producir muestras desnaturalizadas para ser procesadas en distintas tecnologías de análisis de proteínas virales por W o qPCR, incluyen como máximo una escala del orden de ml.



- b) Número de plantas:
 - c) Número de animales:
- 3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada: hasta 2024

(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: Desarrollo de vacunas frente al VPPA
- 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: NO, Pertenería al CBMSO
- 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 aplicable² (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*): Se respeta la normativa y Legislación vigente en cuanto a permisos de transporte de OMG y/o infecciosos. (Se utiliza siempre World Courier).
- 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*): Los OMGs una vez generados, se crecen en macrófagos de cerdo obtenidos de lavados broncoalveolares. Estos macrófagos se siembran en placas Petri (en un volumen habitualmente de máximo 1 ml), en medio de cultivo DEMEM suplementado con 10% FCS comercial. Tras 72 horas de infección, se recogen los cultivos y se centrifugan a 1500rpm, para descartar el pellet de células. El sobrenadante, máximo 5 ml, se titula añadiendo eritrocitos de cerdo. Tras 48 h, las rosetas resultantes de las cepas hemadsorbentes se analizan. Una vez determinado el título, los virus se alicuotean y se conservan a -70°C. Para los OMGs que no fueran hemadsorbentes, se titulan pot TCDI50, utilizando anticuerpos comerciales anti proteínas específicas del VPPA. Igualmente se almacenan a -70°C, alicuoteados en máximo 100 micro litros(ul)

² Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- **(ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas)** del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones
- **Reglamento (CE) 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/>



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

La experimentación se llevará a cabo en el laboratorio de cultivos NCB3 del CBMSO. Donde se seguirán todas las normas de trabajo indicadas en el Manual de Bioseguridad del mismo.

Destacando la utilización de Cabinas de Bioseguridad de clase II A en las cuales como paso previo se inactivarán los residuos generados que posteriormente se autoclavarán y serán gestionados por la empresa contratada en el caso de sólidos, y en el caso de líquidos se inactivarán en la planta de tratamiento de efluentes líquidos.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El CBMSO se encuentra ubicado en una zona del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid que se caracteriza por la amplitud que existe entre los diferentes edificios.

No existen zonas residenciales cercanas, ni zonas de cultivos, explotaciones ganaderas, cotos y reservas de caza. Tampoco zonas naturales protegidas ni de interés ecológico.

El laboratorio con nivel de contención 3 de cultivos celulares está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios que marca la normativa, tanto para las manipulaciones a realizar como en el tratamiento específico de los residuos generados sólidos y líquidos. Estos medios e infraestructuras se validan periódicamente.

La estancia dispone de normas específicas de manipulación que están incluidas en el reglamento de funcionamiento y en los Manuales de Bioseguridad donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, conocidos y al alcance de todos los usuarios. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMGs, limpieza y desinfección de zonas y materiales, esterilización e inactivación se encuentran protocolizados por escrito.

- 2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

Clima continental-mediterráneo caracterizado por presentar inviernos fríos incluso con heladas y veranos muy calurosos.

- 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:

La experimentación se realizará en el laboratorio de cultivos con nivel de contención biológica 3 que fue dado de alta para estas actividades en el año 2017.



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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas básicas de bioseguridad a seguir son las recogidas en los Manuales de Bioseguridad

2) Formación del personal adscrito:

El personal adscrito al laboratorio recibirá una formación teórico-práctica de todos los aspectos a tener en cuenta para realizar la experimentación de forma segura.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Se dispone de procedimientos de desinfección, descontaminación y esterilización que son llevados a cabo por personal técnico especializado en bioseguridad.

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

Controlado por personal de Mantenimiento formado en materia de Bioseguridad las 24horas del día y 365 al año.

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Controlado por personal entrenado y formado de Bioseguridad, Mantenimiento e Instrumentación del CBMSO.

X. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1) Encargado de la gestión de residuos:

a) gestión interna: SÍ NO

b) gestión por una empresa externa: SÍ NO

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

SERVICIOS INTEGRALES SANITARIOS MADRID SL (SIS). MADRID

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

Los residuos sólidos se inactivan usando desinfectantes químicos antes de salir de las Cabinas de Bioseguridad, después se autoclavan y posteriormente son retirados por la empresa contratada.

Los residuos líquidos son inactivados por calor en el sistema de tratamiento de efluentes líquidos del que dispone la instalación. (Biowaste).



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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Siguiendo las Normas de trabajo establecidas y teniendo en cuenta el nivel de contención de la Instalación, es difícil que se produjera un accidente.

En el Plan de Autoprotección vienen indicadas y se indicaron en el apartado VI de la solicitud de autorización (A/ES/17/I-22)

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Vienen detallados en el Plan de Emergencia, incluido en el apartado VI de la solicitud de autorización del laboratorio de Cultivos. (A/ES/17/I-22).

Añadidos recientemente equipos de protección respiratoria con un capuz conectado a un motor de ventilación con baterías recargables.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

El manual de Bioseguridad del laboratorio está disponible para el usuario tanto en papel como en la web del CBM. Una vez leída y comprendida toda la parte teórica recibirán una formación práctica.

4) Planes de emergencia:

Incluidos en el plan de Autoprotección del edificio e incluidos en la memoria de notificación de la Instalación. Conocidos por el personal usuario del laboratorio.



**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 BIOLOGÍA MOLECULAR SEVERO OCHOA (CSIC-UAM)
Dirección postal: C/ NICOLAS CABRERA 1, 28049 MADRID

- 2) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: LOURDES RUIZ DESVIAT
NIF: 05253811J
Cargo: DIRECTORA
Tel: 911964424
Fax:
Correo electrónico: direccion@cbm.csic.es

- 3) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos: Yolanda Revilla Novella
NIF:02848201L
Cargo: Jefe de Grupo. Investigadora Científica CSIC
Tel:911964570
Fax:
Correo electrónico: yrevilla@cbm.csic.es

- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
Nombre y apellidos: GEMA CAPARRÓS DE LA JARA
NIF: 05432793D
Cargo: RESPONSABLE DE BIOSEGURIDAD
Tel: 911964537
Fax:
Correo electrónico: gcaparros@cbm.csic.es

- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto

Yolanda Revilla y Gema Caparrós



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: El objetivo es la Investigación, la formación de científicos y el desarrollo de vacunas efectivas frente al VPPA.
- 2) Duración prevista de la actividad: Desde Diciembre 2022 a Diciembre de 2024

(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. Puede infectar cerdo doméstico y jabalí.
- b) Organismo donante. No tienen propiedades nocivas: el GFP (Procede de la medusa de cristal (Aequorea victoria) es una medusa bioluminiscente del orden Hydroida). El segundo marcador mCherry DsRed se aísla de la anémona Discosoma.
- c) Inserto. GFP y dsCherry, derivados de los vectores
- d) Vector. Se usan dos tipos de vectores (i) uno derivado de pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459), y (ii) un vector derivado de pcDNA3.1 que contiene las secuencias flanqueantes de los genes diana virales, (EP402R(CD2) o A238L), rodeando al marcador GFP, derivado del vector pEGFP-E3 o alternativamente, el gen mCherry derivado del vector pmCherry-N1.
- e) Organismo modificado genéticamente resultante.
deltaCD2deltaA238LGFP/Cherry. Es un virus muy atenuado, que no produce enfermedad. Se requiere más investigación para realizar una curva de dosis y establecer la dosis letal 50.
- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.



Humano En las condiciones de trabajo es muy improbable que se produzca una reversión de la atenuación por lo que los efectos para la salud animal son prácticamente nulos.

g) Efectos para el medio ambiente. No

2) Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

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

Tipo 1

Tipo 2

Tipo 3

Tipo 4

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

a) Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental). Manipulación de una cepa virulenta del VPPA, crecimiento y aislamiento de las partículas virales.

b) Concentración y escala utilizadas. Micro molar, microlitros, nanogramos.

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).

Cultivo del virus en células susceptibles, en el laboratorio NCB3 de cultivos cuyo grado de confinamiento evitaría una posible dispersión.

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

La actividad se clasifica como de nivel 3. El laboratorio de cultivos están equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios, tanto para las manipulaciones a realizar como en el tratamiento de residuos generados.

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 CBMSO se encuentra ubicado en una zona del Campus de la Universidad Autónoma de Madrid que se caracteriza por la amplitud que existe entre los diferentes edificios.

No existen zonas residenciales cercanas, ni zonas de cultivos, explotaciones ganaderas, cotos y reservas de caza. Tampoco zonas naturales protegidas ni de interés ecológico.

El laboratorio con nivel de contención 3 de cultivos celulares está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesarios que marca la normativa, tanto para las manipulaciones a realizar como en el tratamiento específico de los residuos generados sólidos y líquidos. Estos medios e infraestructuras se validan periódicamente.

La estancia dispone de normas específicas de manipulación que están incluidas en el reglamento de funcionamiento y en los Manuales de Bioseguridad donde se especifican las normas de higiene, protección, contención y gestión de residuos, conocidos y al alcance de todos los usuarios. Todos los protocolos de manipulación, transporte y conservación de agentes biológicos y OMGs, limpieza y desinfección de zonas y materiales, esterilización e inactivación se encuentran protocolizados por escrito.

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

Siguiendo las Normas de trabajo establecidas y teniendo en cuenta el nivel de contención de la Instalación, es difícil que se produjera un accidente.

En el Plan de Autoprotección vienen indicadas y se indicaron en el apartado VI de la solicitud de autorización (A/ES/17/I-22)

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

El laboratorio dispone de los sistemas de alarma conectados a la alarma central del edificio realizándose los controles de verificación y correcto funcionamiento como en el resto del edificio.

En el Plan de Emergencias están indicados los pasos a seguir en caso de alarma parcial o total del edificio.

- d) Planes de emergencia.

Incluidos en el plan de Autoprotección del edificio e incluidos en la memoria de notificación de la Instalación. Conocidos por el personal usuario del laboratorio.