



**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-INIA/CSIC); Centro Nacional Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC); Ministerio de Ciencia e Innovación**

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

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: **Esther Esteban Rodrigo**

NIF: **05271582M**

Cargo: **Directora del INIA**

Tel:

Fax:

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

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: **Aitor Nogales González**

NIF: **51986340S**

Cargo: **Científico titular del CSIC**

Tel: **91 6202300**

Fax: **91 6202247**

Correo electrónico: **nogales.aitor@inia.csic.es**

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

Nombre y apellidos: **Laura Pérez Palancar**

NIF: **53043241C**

Cargo: **Jefe de Área de Animalario y Seguridad Biológica**

Tel: **91 6202300**

Fax: **91 6202247**

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

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

-Organismo financiador:

- 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: **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: **Los brotes de gripe aviar del año 2021-2022 en Europa han hecho saltar las alarmas por la posible emergencia de nuevos virus pandémicos. Estos brotes fueron de especial relevancia porque afectaron a diferentes granjas y aves silvestres de toda España, y también por la aparición de casos en humanos en Europa y otras regiones del mundo. El objetivo de este proyecto es analizar la protección serológica basal de poblaciones de diferentes edades frente a los virus de gripe aviar A(H5N1) y A(H7N9), la respuesta a las vacunas antigripales estacionales y la relación de estos parámetros con la edad del paciente y el fenómeno del Pecado Original Antigénico (POA). En este proyecto colaborativo, construiremos virus recombinantes H5N1 y H7N9 con el backbone de A/PuertoRico8/1934 (H1N1) (PR8) que expresen o no la proteína NanoLuc (Luciferasa). Estos virus serán utilizados para realizar ensayos de inhibición de hemaglutinación (virus inactivado), y ensayos de microneutralización viral (virus vivo). Mediante estos ensayos conoceremos la cantidad y tipo de anticuerpos presentes antes de la vacunación que sean capaces de reconocer los virus aviares analizados, y la posterior respuesta humoral generada por las vacunas antigripales estacionales por respuestas heterótípicas. Adicionalmente, conoceremos si esta respuesta está condicionada por la edad del paciente, en relación con los virus que probablemente les primo-infectaron en la**

<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.



**infancia y el fenómeno del POA. Finalmente, este proyecto permitirá conocer el grado de protección de la población, frente a una posible pandemia originada por gripe aviar.**

**Cabe destacar que los virus que se generarán ya existen en otros laboratorios, y por tanto no se prevé ningún problema en su generación, manipulación o seguridad. Aunque el uso del virus A/PuertoRico8/1934 (H1N1) (PR8) se clasifica como actividad de tipo 2, la incorporación en el mismo de genes procedentes de gripe aviar, implica que la actividad se clasifique como de tipo 3.**

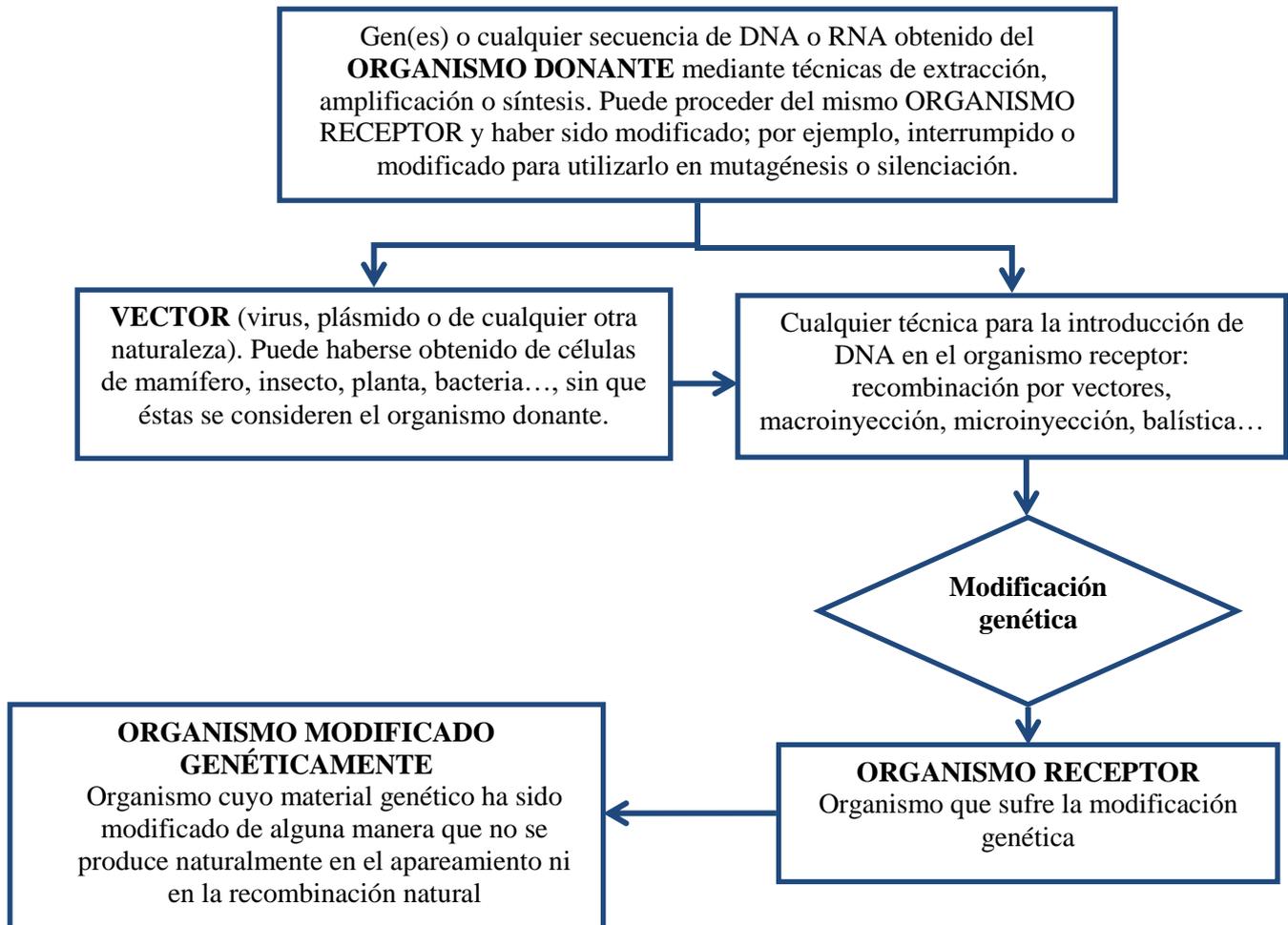
2) Clasificación de la actividad:

*(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:

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

**Nombre común:** Virus de la gripe, virus de la Influenza A o Influenza A virus (IAV)

**Organismo donante:** genes de IAV H5N1 y H7N9 (sintetizados por una empresa del sector) y NanoLuc luciferasa (obtenida por PCR de un plásmido).

**Organismo receptor:** la cepa de IAV A/PuertoRico8/1934 (H1N1).

**OMGs:** Nuevos virus recombinantes de IAV serán generados mediante técnicas de genética reversa, ya establecidas en el campo. Algunos de los virus recombinantes también expresarán la luciferasa Nanoluc como un gen reportero para seguir la infección de células (Tabla 1). En este proyecto colaborativo, construiremos virus recombinantes que contengan los genes H5N1 y H7N9 con el backbone o los otros 6 segmentos virales de A/PuertoRico8/1934 (H1N1) (PR8) que expresen o no la proteína NanoLuc (Luciferasa).

**Tabla 1. Resumen de los virus recombinantes que serán generados y características genotípicas.**

Virus recombinante	Segmento 1, 2, 3, 5, 7	Segmento 4 (HA)*	Segmento 6 (NA)	Segmentos 8 (NS)
PR8 H5N1	PR8	IAV H5N1	IAV H5N1	PR8
PR8/Nluc H5N1	PR8	IAV H5N1	IAV H5N1	PR8 NS-Nluc
PR8 H7N9	PR8	IAV H7N9	IAV H7N9	PR8
PR8/Nluc H7N9	PR8	IAV H7N9	IAV H7N9	PR8 NS-Nluc

\* Por motivos de seguridad, en el caso de H5 se eliminará el sitio de corte polibásico de la proteína HA (una modificación empleada en vacunas para H5N1, incluido vacunas para humanos), lo que da como resultado un crecimiento in vitro dependiente de tripsina.

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

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



- 2: Blanco-Lobo P, Nogales A, Rodríguez L, Martínez-Sobrido L. Novel Approaches for The Development of Live Attenuated Influenza Vaccines. *Viruses*. 2019 Feb 22;11(2):190. doi: 10.3390/v11020190. PMID: 30813325.
- 3: Nogales A, Perez DR, Santos J, Finch C, Martínez-Sobrido L. Reverse Genetics of Influenza B Viruses. *Methods Mol Biol*. 2017;1602:205-238. doi:10.1007/978-1-4939-6964-7\_14. PMID: 28508223.
- 4: Nogales A, Martínez-Sobrido L. Reverse Genetics Approaches for the Development of Influenza Vaccines. *Int J Mol Sci*. 2016 Dec 22;18(1):20. doi:10.3390/ijms18010020. PMID: 28025504.
- 5: Breen M, Nogales A, Baker SF, Martínez-Sobrido L. Replication-Competent Influenza A Viruses Expressing Reporter Genes. *Viruses*. 2016 Jun 23;8(7):179. doi: 10.3390/v8070179. PMID: 27347991.

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- a) Técnicas de aislamiento: **Los virus silvestres son generalmente aislados en cultivos celulares (células MDCK o Vero) o en huevos, a partir de muestras de diversa procedencia dependiendo del organismo infectado. Los genes de los aislados naturales requeridos para el trabajo, serán sintetizados de novo (Biomatik o GenScript) como se indica en las correspondientes secciones. Los virus recombinantes serán obtenidos mediante la transfección de células, con 8 plásmidos que codifican para el genoma completo de IAV. Posteriormente, el virus será recuperado del sobrenadante de los cultivos celulares y los virus recombinantes (con o sin gen reportero) rescatados, serán utilizados para infectar cultivos de células permisivas.**
- b) Técnicas de identificación: **PCR, secuenciación, western blot, microscopía de fluorescencia, cuantificación de luciferasa, cultivos celulares (efecto citopático en cultivos celulares).**
- c) Marcadores genéticos: **Las secuencias de los virus silvestres son públicas y pueden encontrarse en bases de datos como las alojadas en “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI). En el caso de los virus recombinantes, serán introducidos cambios en dos (HA, NA) o tres segmentos (HA, NA y NS) que permitirán diferenciar los virus recombinantes de los aislados naturales. Por otra parte el virus PR8 no circula actualmente entre la población humana, y solo se encuentra en laboratorios.**
- d) Marcadores fenotípicos: **Los aislados naturales causan un efecto citopático en células de mamíferos (MDCK o Vero) y aves, además de inducir cambios en la morfología celular como consecuencia de la infección. En el caso de los virus que expresen genes reporteros, estos servirán también como marcador fenotípicos, observándose en cultivos celulares la expresión del gen reportero (bioluminiscencia).**
- e) Estabilidad genética: **La estabilidad genética de los virus recombinantes obtenidos por genética reversa, se espera similar o igual al de los aislados naturales u otros virus rescatados mediante genética reversa.**



- 3) Posibles modificaciones genéticas anteriores: **No aplica**
- 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: **El virus de la Influenza, dependiendo del subtipo o cepa infecta un amplio espectro de especies de mamíferos (incluyendo humanos, cerdos, caballos, perros, etc) y aves (silvestres y domésticas). No obstante la cepa PR8 se considera avirulenta en humanos, y solo es patogénica en algunos modelos de ratón de laboratorio. Además es la cepa de virus que se utiliza para el desarrollo de las vacunas inactivadas para proteger a la población frente a IAV estacional.**

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.*): **Clasificación 2 según la Directiva 2000/54/CE. Aunque el uso del virus A/PuertoRico8/1934 (H1N1) (PR8) se clasifica como actividad de tipo 2, la incorporación en el mismo de genes procedentes de gripe aviar (H5N1 o H7N9), implica que la actividad se clasifique como de tipo 3.**

- a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad? **La infección por IAV o gripe produce enfermedad respiratoria o gastrointestinal de mayor o menor gravedad dependiendo del subtipo de virus, la especie infectada, y el estado de salud del sujeto infectado. La infección también puede ser asintomática. IAV causa una infección contagiosa que se caracteriza por la aparición de fiebre, pudiendo ir acompañada de escalofríos, sudoración, cefaleas, dolores musculares, astenia, anorexia, conjuntivitis y/o síntomas respiratorios (congestión nasal, dolor de garganta, tos seca). Pueden producirse complicaciones respiratorias (neumonía, bronquitis, sobreinfecciones bacterianas broncopulmonares, sinusitis), auditivas (otitis), y menos frecuentemente cardiovasculares o neurológicas. También puede producirse deshidratación y empeoramiento de condiciones médicas crónicas preexistentes, como asma, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), fibrosis quística, o diabetes. No obstante la cepa PR8 se considera avirulenta en humanos. Además es la cepa de virus que se utiliza para el desarrollo de las vacunas inactivadas para proteger a la población frente a IAV estacional.**
- b) En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI  NO

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



**coinfecciones entre cepas virulentas y avirulentas, el riesgo de reversión a patogenicidad es mínimo o inexistente.**

- 6) La cepa/línea celular receptora: **¿está libre de agentes biológicos contaminantes? Todas las líneas celulares que se utilizan son testadas para evaluar la presencia de micoplasmas. Además las líneas celulares se mantienen en presencia de antibióticos para evitar contaminaciones. Igualmente, las células son examinadas en un microscopio antes de su uso, para verificar el buen estado de las mismas. Por tanto, las líneas celulares utilizadas están libres de agentes biológicos contaminantes.**
- 7) Experiencia adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor: **El grupo de investigación del INIA-CISA y el investigador que envía la solicitud posee una dilatada experiencia (15-20 años) en trabajos de investigación, y actividades científicas y técnicas utilizando diversos agentes virales de relevancia en sanidad animal y humana, incluyendo múltiples tipos de IAV. Además se cuenta con gran experiencia en técnicas de genética reversa o el desarrollo de herramientas biotecnológicas. El uso de la cepa de IAV PR8 está extendida en todos los laboratorios de gripe del mundo.**
- 8) 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                    | <input type="checkbox"/> |
| ii) endosporas                | <input type="checkbox"/> |
| iii) quistes                  | <input type="checkbox"/> |
| iv) esclerocios               | <input type="checkbox"/> |
| v) esporas asexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |
| vi) esporas sexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |

vii) otros, especifíquese

- c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia: **La exposición a temperaturas iguales o mayores a 37°C, baja humedad, luz ultravioleta, o a agentes químicos reduce drásticamente la capacidad de supervivencia de IAV fuera de las condiciones de cultivo.**
- d) Posibles nichos ecológicos: **Los mismos que los aislados naturales de IAV. Además los virus recombinantes generados solo causarían patogénia en algunos modelos murinos infectados con una gran cantidad de virus. No obstante, la actividad se va**



a llevar a cabo en un laboratorio del CISA-INIA-CSIC, instalación con nivel de bioseguridad tipo 3. El OMG estará confinado a este espacio y no saldrá del mismo.

- e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: **Los mismos que los aislados naturales de IAV. Además los virus recombinantes generados solo causarían patogénia (en base a datos publicados por otros laboratorios) en algunos modelos murinos de laboratorio infectados con una gran cantidad de virus. No obstante, la actividad se va a llevar a cabo en un laboratorio del CISA-INIA-CSIC, instalación con nivel de bioseguridad tipo 3.**

9) 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: **Los virus recombinantes generados solo causarían patogénia en algunos modelos murinos de laboratorio infectados con una gran cantidad de virus (en base a datos publicados por otros laboratorios).**

10) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor: **El virus de la Influenza se encuentra distribuido globalmente y es capaz de infectar (dependiendo de la cepa y tipo) una gran cantidad de especies de mamíferos y aves. La cepa de virus PR8 no circula en humanos, y es además la utilizada para fabricar las vacunas inactivadas frente a la gripe estacional en humanos.**

11) Hábitat natural del organismo: **IAV se encuentra distribuido por todo el mundo.**

#### **IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE**

1) Nombre científico:

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

Nombre común: **Virus de la gripe, virus de la Influenza A o Influenza A virus (IAV)**

**Organismo donante: genes de IAV H5N1 y H7N9 (sintetizados por una empresa del sector) y NanoLuc luciferasa (obtenida por PCR de un plásmido).**

**Organismo receptor: la cepa de IAV A/PuertoRico8/1934 (H1N1).**

**OMGs: Nuevos virus recombinantes de IAV serán generados mediante técnicas de genética reversa, ya establecidas en el campo. Algunos de los virus recombinantes también expresarán**



la luciferasa Nanoluc como un gen reportero para seguir la infección de células (Tabla 1). En este proyecto colaborativo, construiremos virus recombinantes que contengan los genes H5N1 y H7N9 con el backbone o los otros 6 segmentos virales de A/PuertoRico8/1934 (H1N1) (PR8) que expresen o no la proteína NanoLuc (Luciferasa).

**Tabla 1. Resumen de los virus recombinantes que serán generados y características genotípicas.**

Virus recombinante	Segmento 1, 2, 3, 5, 7	Segmento 4 (HA)*	Segmento 6 (NA)	Segmentos 8 (NS)
PR8 H5N1	PR8	IAV H5N1	IAV H5N1	PR8
PR8/Nluc H5N1	PR8	IAV H5N1	IAV H5N1	PR8 NS-Nluc
PR8 H7N9	PR8	IAV H7N9	IAV H7N9	PR8
PR8/Nluc H7N9	PR8	IAV H7N9	IAV H7N9	PR8 NS-Nluc

\* Por motivos de seguridad, en el caso de H5 se eliminará el sitio de corte polibásico de la proteína HA (una modificación empleada en vacunas para H5N1, incluido vacunas para humanos), lo que da como resultado un crecimiento in vitro dependiente de tripsina.

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

1: Martínez-Sobrido L, DeDiego ML, Nogales A. AGL2017-82570-RR reverse genetics approaches for the development of new vaccines against influenza A virus infections. *Curr Opin Virol.* 2020 Oct;44:26-34. doi:10.1016/j.coviro.2020.06.001. Epub 2020 Jun 27. PMID: 32599532.

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

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

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

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

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: El virus de la gripe tiene un genoma de ARN de polaridad negativa y segmentado. El genoma está compuesto por 8 segmentos. La genética reversa de PR8 ya se encuentra en el laboratorio, y ha sido obtenida de un colaborador. Los genes que codifican los segmentos HA y NA de H5N1 y H7N9 se sintetizarán de novo (Biomatik o GenScript). El segmento HA y NA codifican para la hemaglutinina y Neuraminidasa del virus, las cuales determinan el subtipo de virus y son las principales dianas (principalmente la HA) de anticuerpos neutralizantes. Las proteínas están implicadas en la entrada y salida del virus a la célula, entre otras funciones.



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

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

Con el fin de obtener las secuencias de la luciferasa NanoLuc utilizaremos plásmidos comerciales (pNL1.1-Nluc; Promega #N1001) y los genes serán extraídos mediante PCR y posteriormente clonados en el segmento 8 modificado que contiene la secuencia 2A (NS1-2A), como ya se ha descrito anteriormente.

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

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

**3: Park JG, Ávila-Pérez G, Nogales A, Blanco-Lobo P, de la Torre JC, Martínez-Sobrido L. Identification and Characterization of Novel Compounds with Broad-Spectrum Antiviral Activity against Influenza A and B Viruses. *J Virol.* 2020 Mar17;94(7):e02149-19. doi: 10.1128/JVI.02149-19. PMID: 31941776.**

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

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

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

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



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

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

Método de obtención:

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

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

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

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

4) ¿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? **La infección por IAV o gripe produce enfermedad respiratoria o gastrointestinal de mayor o menor gravedad**



dependiendo del subtipo de virus, la especie infectada, y el estado de salud del sujeto infectado. IAV causa una infección contagiosa que se caracteriza por la aparición de fiebre, pudiendo ir acompañada de escalofríos, sudoración, cefaleas, dolores musculares, astenia, anorexia, conjuntivitis y/o síntomas respiratorios (congestión nasal, dolor de garganta, tos seca). Pueden producirse complicaciones respiratorias (neumonía, bronquitis, sobreinfecciones bacterianas broncopulmonares, sinusitis), auditivas (otitis), y menos frecuentemente cardiovasculares o neurológicas. También puede producirse deshidratación y empeoramiento de condiciones médicas crónicas preexistentes, como asma, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), fibrosis quística, o diabetes.

No obstante cabe destacar, que en este caso se partirá de genes sintéticos, producidos y clonados por una empresa. Por tanto no se trabajará con el organismo donante vivo (virus IAV H5N1 o H7N9) directamente. Esto es importante en materia de seguridad, ya que no manejaremos el patógeno.

En el caso de los genes reporteros no se ha descrito un papel en patogénesis y serán obtenidos mediante PCR utilizando como molde un plásmido comercial.

PTV-1, del que solo se usará una secuencia de 19 aminoácidos, es un virus que afecta principalmente a cerdos. La infección por PTV puede ser subclínica o causar encefalomielitis y enfermedad grave o leve. La PTV se ha asociado en algunos casos con diarrea, neumonía, pericarditis y miocarditis. No se ha descrito que la secuencia 2A utilizada sea un factor de virulencia por si solo o fuera del contexto de PTV-1

- c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo? **SI en el caso de las proteínas de IAV (H5N1 y H7N9) y NO en el caso de proteínas bioluminiscentes o la secuencia 2A.**
- d) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural? **El genoma de gripe está compuesto por 8 segmentos virales. En ocasiones cuando una misma célula se infecta con dos o más tipos de IAV, pueden surgir virus que contengan una composición genética distinta a los virus originales. Esta reorganización de segmentos, es común en virus con genomas segmentados. No obstante, en este caso los genes del organismo donante (H5N1 y H7N9) serán sintetizados de novo y clonados en plásmidos. Posteriormente, se rescataran los virus deseados empleando técnicas de genética reversa, como ya indicado anteriormente.**

## 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: **En este proyecto, construiremos virus recombinantes H5N1 y H7N9 con el backbone de A/PuertoRico8/1934 (H1N1) (PR8) que expresen o no la proteína NanoLuc (Luciferasa). Estos virus serán utilizados para realizar ensayos de inhibición de hemaglutinación y ensayos de microneutralización viral.**
- 3) Método utilizado para llevar a cabo la modificación genética: **Los segmentos de IAV PR8 están clonados en plásmidos ambisentido. Los genes H5N1 y H7N9 serán sintetizados de novo y clonados en los mismos plásmidos por una compañía (Biomatik o Genscript). El segmento 8 recombinante conteniendo la secuencia 2A para insertar el gen NanoLuc también está clonado en un plásmido ambisentido. Posteriormente los genes reporteros serán amplificados por PCR y clonados en el segmento 8 modificado que contiene la secuencia 2A de PTV-1. Tanto el plásmido ambisentido como la genética reversa de PR8 y un plásmido comercial con NanoLuc, se encuentran en el laboratorio o se obtendrán de colaboradores. El virus modificado genéticamente (PR8 H5N1 con o sin Nluc y PR8 H7N9 con o sin Nluc) se recupera por transfección de células con los 8 plásmidos que codifican cada uno de los genes/segmentos de IAV. En el caso del segmento 8, se usarán distintas alternativas utilizando plásmidos que contengan el segmento original o las versión modificadas para expresar Nluc.**

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

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

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

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

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

SÍ  NO

En caso afirmativo:

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

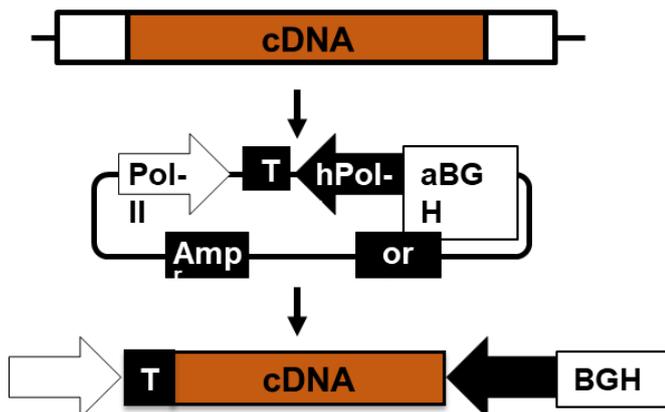
b) Si se trata de un virus: **No aplica**

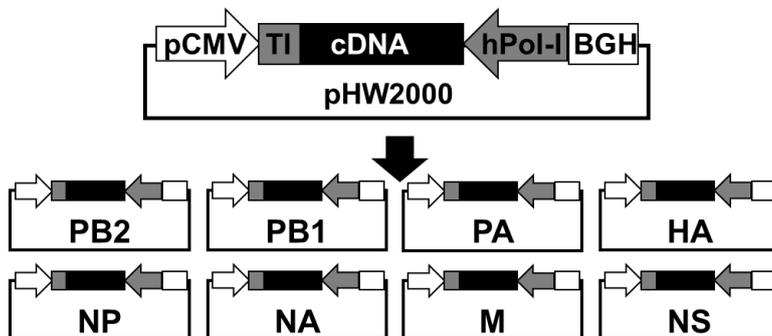
Es defectivo en replicación SÍ  NO

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*):

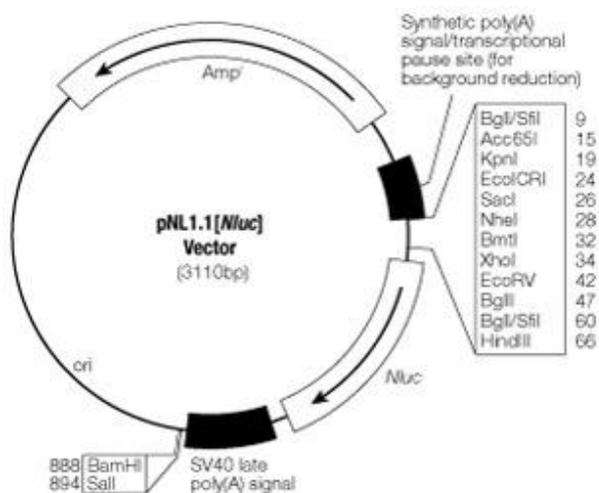
**Los vectores utilizados para insertar los genes sintéticos no producen ninguna propiedad nociva. Además, los virus recombinantes generados por genética reversa no incorporan ninguna secuencia del vector utilizado.**

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





Plásmidos que contienen los genes reporteros. (pNL1.1-Nluc; Promega #N1001).



d) Gama de hospedadores del vector: **Todos los plásmidos son amplificados en bacterias.**

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? **Todos los plásmidos son amplificados en bacteria, por tanto contienen un origen de replicación y el gen de resistencia a Ampicilina. Ninguno de estos genes (u otras secuencias de bacterias) son transferidos al virus, y solo se utilizan para la propagación del plásmido en cultivos de bacterias.**

5) Información del inserto:



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

1. Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai(H1N1)) segment 8, complete sequence 890 bp linear RNA AF389122.1 GI:21693177
2. Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai(H1N1)) segment 7, complete sequence 1,027 bp linear RNA AF389121.1 GI:21693174
3. Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai(H1N1)) segment 6, complete sequence 1,413 bp linear RNA AF389120.1 GI:21693172
4. Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai(H1N1)) segment 5, complete sequence 1,565 bp linear RNA AF389119.1 GI:21693170
5. Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai(H1N1)) segment 4, complete sequence 1,775 bp linear RNA AF389118.1 GI:21693168
6. Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai(H1N1)) segment 3, complete sequence 2,233 bp linear RNA AF389117.1 GI:21693166
7. Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai(H1N1)) segment 2, complete sequence 2,341 bp linear RNA AF389116.1 GI:21693164
8. Influenza A virus (A/Puerto Rico/8/34/Mount Sinai(H1N1)) segment 1, complete sequence 2,341 bp linear RNA AF389115.1 GI:21693162

#### 9. A/Anhui/1/2013 H7N9 HA

Agcaaaagcaggggatacaaa

atgaacactcaaatcctggtattcgtctgattgcgatcattccaacaaatgcagacaaaatctgcctcggacatcatgc  
cgtgtcaaacggaacaaagtaaacacattaactgaaagaggagtggaaagtcgtaactgcaactgaaacagtggaaacgaa  
caaacatccccaggatctgctcaaaagggaaaaggacagttgacctcgggcaatgtggactcctggggacaatcactgga  
ccacctcaatgtgaccaattcctagaatcttcagccgatttaattattgagaggcgagaaggaagtgtctgttatcc  
tgggaaattcgtgaatgaagaagctctgaggcaaatctcagagaatcaggcggaattgacaaggaagcaatgggattca  
catacagtggaaataagaactaattggagcaaccagtgcatgtaggagatcaggatcttcattctatgcagaaatgaaatgg  
ctcctgtcaaacacagataatgctgcattcccgagatgactaagtcataaaaaatacaagaaaaagcccagctcta  
agtatgggggatccatcattccgtatcaactgcagagcaaaccaagctatatgggagtggaaacaaactgggtgacagttg  
ggagttctaattatcaacaatctttgtaccgagtcaggagcgagaccacaagttaatgggtctatctggaagaattgac  
tttcattggtaatgctaaatcccaatgatacagtcactttcagttcaatggggctttcatagctccagaccgtgcaag  
cttctgagaggaaaatctatgggaatccagagtgtagtacaggttgatgccaattgtgaaggggactgctatcatagtg  
gagggacaataataagtaacttgcattcagaacatagatagcagggcagttggaaaatgtccgagatatgtaagcaa  
aggagctctgctgtagcaacagggatgaagaatgttctgagattccaaaggaagaggcctatttgggtctatagcggg  
tttcattgaaaatggatgggaaggcctaattgatggttggtatggttcagacaccagaatgcacagggagagggaaactg  
ctgcagattacaaaagcactcaatcggcaattgatcaataacaggaaaattaaaccggttatagaaaaaaccaacaa  
caatttgagttgatagacaatgaattcaatgaggtagagaagcaaatcggaatgtgataaattggaccagagattctat  
aacagaagtgtggtcatacaatgctgaactcttgtagcaatggagaaccagcatacaatgactgggtgattcagaaa  
tggacaaactgtacgaacgagtgaaaagacagctgagagagaatgctgaagaagatggcactggttctttaaattt  
cacaagtgtgatgactgtatggccagtttagaaataacacatgatcacagcaatacaggaagaggcaatgca  
aatagaatacagattgaccagctcaactaagcagcggctacaaagatgtgatacttggtttagcttcggggcatcat  
gttcatactctagccattgtaattgggccttcttcatatgtgtaagaatggaaacatgcggtgactatttgtata  
taagtttggaaaaaacacccttcttacT

#### 10. A/Anhui/1/2013 H7N9 NA

AGcaaaagcagggtaag

atgaatccaaatcagaagattctatgcacttcagccactgctatcataataggcgcaatcgagactcattggaatagc



aaacctaggattgaacataggactgcatctaaaaccgggctgcaattgctcacaactcacaacctgaaacaaccaacacaa  
gccaacaataataaacaactattataatgaaacaaacatcaccaacatccaaatggaagagagaacaagcaggaatttc  
aataacttaactaaagggctctgtactataaattcatggcacatataatgggaaagacaatgcagtaagaattggagagag  
ctcggatgttttagtcacaagagaaccctatgtttcatgcgaccagatgaatgcaggttctatgctctcagccaaggaa  
caacaatcagagggaaacactcaaacggaacaatacacgataggtcccagatcgcgcctgataagctggccactatca  
tcaccgcccacagtgtacaacagcaggggtggaatgcattgggtggcaagtactagtgtccatgatggcaaatccaggat  
gtcaatatgtatcaggaccaacaacaatgcatctgcagtagtatggtacaacagaaggcctgttcagaaattaaca  
catggggccgaaacatactaagaacacaggaatctgaatgtgtatgccacaacggcgatgccagtagtgttcaccgat  
gggtctgccactggacctgcagacacaagaatatactattttaagaggggaaaatattgaaatgggagtctctgactgg  
aactgctaagcatattgaagaatgctcatgttacggggaacgaacaggaattacctgcacatgcagggacaattggcagg  
gtcaaatagaccagtgattcagatagaccagtagcaatgcacacactagtcaatatatgtagtctgtttcttaca  
gacaatccccgaccgaatgacccaatataggtgaagtgaatgaccttatccaggaataataacaatggagtcaaggg  
attctcactggatggggtaaaccttggctagggaggacaataagcacagcctcgaggtctggatacgagatgttaa  
aagtgcacaatgcattgacagatgatagatcaaagccattcaaggctcagacaattgtattaaacgctgactggagtggt  
tacagtggatctttcatggactattgggctgaaggggactgctatcgagcgtgttttatgtggagttgatactggaag  
accaaggaagataaagtgtggtggaccagcaatagtagtatcgatgtgtccagtacagaattcctgggacaatgga  
actggcctgatggggctaaaatagagtacttctctaagatgaagaaaaagacctgtttctacT

**11. Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)) segment 6 neuraminidase (NA) gene, complete cds 1,398 bp linear cRNA HM006761.1 GI:291359312**

**12. Influenza A virus (A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds 1,779 bp linear cRNA HM006759.1 GI:291359308**

Por motivos de seguridad, en el caso de H5 se eliminará el sitio de corte polibásico de la proteína HA (una modificación empleada en vacunas para H5N1, incluido vacunas para humanos), lo que da como resultado un crecimiento in vitro dependiente de tripsina.

**A**  
Influenza A/Viet Nam/1203/04 HA sequence (nts 1009-1041 of ORF)  
P Q R E (R R R K K) R / G  
CCT CAA AGA GAG A(GA AGA AGA AAA AA)G AGA / GGA  
↓  
Low pathogenic avian consensus sequence  
P Q R E T R / G  
CCT CAG CGG GAG ACG CGG / GGA

Live attenuated influenza viruses containing NS1 truncations as vaccine candidates against H5N1 highly pathogenic avian influenza. Steel J, Lowen AC, Pena L, Angel M, Solórzano A, Albrecht R, Perez DR, García-Sastre A, Palese P. J Virol. 2009 Feb;83(4):1742-53. doi: 10.1128/JVI.01920-08. Epub 2008 Dec 10. PMID: 19073731

**13. IAV (PR8) NS1/2A/NEP seq (1204 nucleótidos): Secuencia del segment 8 modificado para inserter el gen reporter.**

**CGTCTCAGGG**  
agcaaaaagcaggggtgacaaagacataatggatccaaacactgtgtcaagctttcaggtagattgctttctttggcatgtc  
cgcaaacgagttgcagaccaagaactaggtgatgccccattccttgatcggtctcgccgagatcagaaatccctaagagg  
aaggggcagcaccctcggctctggacatcgagacagccacacgctgctggaaagcagatagtgagcggattctgaaagaag  
aatccgatgaggcacttaaaatgacctggcctctgtacctgctgcgcttacctaactgacatgactcttgaggaaatg  
tcaagggactggtccatgctcatacccaagcagaaagtggcagggcctctttgtatcagaatggaccagggcgatcatgga  
taagaacatcatactgaaagcgaacttcagtgtgatttttgaccggctggagactctaataattgctaagggccttcaccg  
aagagggagcaattgttggcgaatctcaccattgccttctctccgggacatactgctgaggatgtcaaaaatgcagtt



```
ggagtcctcatcgggggacttgaatggaatgataacacagttcgagtctctgaaactctacagagattcgcttggagaag
cagtaatgagaatgggagacctccactcactccaaaacagaaacgagaaatggcggaacaattagaagcgaagttGGCA
CCGGTGCTAGCGGC GCGACCAACTTTAGCCTGCTGAAACAGGCGGGCGATGTGGAAGAAAACCCGGGCCCG atggatccaaaca
gtgtcaagctttcaggacatactgctgaggatgtcaaaaatgcagttggagtcctcatcgggggacttgaatggaatgataaca
gttcgagtctctgaaactctacagagattcgcttggagaagcagtaatgagaatgggagacctccactcactccaaaacagaaa
agaaatggcggaacaattaggtcagaagtttgaagaaataagatggttgattgaagaagtgagacacaaactgaagataacag
aatagttttgagcaaataacatttatgcaagccttacatctattgcttgaagtgagcaagagataagaactttctcgtttcag
tatttaataataaaaaaacacccttgtttctact
AATAAGAGACG
```

Lowercase: Viral seq

Uppercase: foreign Seq

Blue: NCR

Red: SAM

Orange: Uppercase orange AgeI-NheI (GTGASG) for cloning of reporter gene.

Yellow: PTV-2A

Grey: NS1

Pink: NEP

#### 14. NanoLuc (516 nucleótidos):

```
atggtcttcacactcgaagattcgttggggactggcgacagacagccggctacaacctggaccaagtccttgaacaggaggtgtgtccagttgtttcag
aatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaatgggctgaagatcgacatccatgtcatcatccggtatgaaggctgag
cggcgaccaaattggccagatcgaaaaaattttaaggtggtgtaccctgtggatgatcatcacttaaggtgatcctgcactatggcacactggtaacgac
ggggttacgccgaacatgatcactatttcggacggccgtatgaaggcatcgccgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaac
ggcaacaaaattatcgacgagcgcctgatcaaccccgacggctcctgctgtccgagtaacatcaacggagtgaccggctggcggtgtgcgaacg
cattctggcgtaa
```

- b) Origen y función específica de cada parte del inserto: **Segmentos del genoma de IAV: Dichos segmentos/genes codifican para las diferentes proteínas virales de IAV y tienen las mismas funciones.**



#### Influenza A virus proteins and their functions

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

[Open in a separate window](#)

N<sup>o</sup>, influenza virus segment number

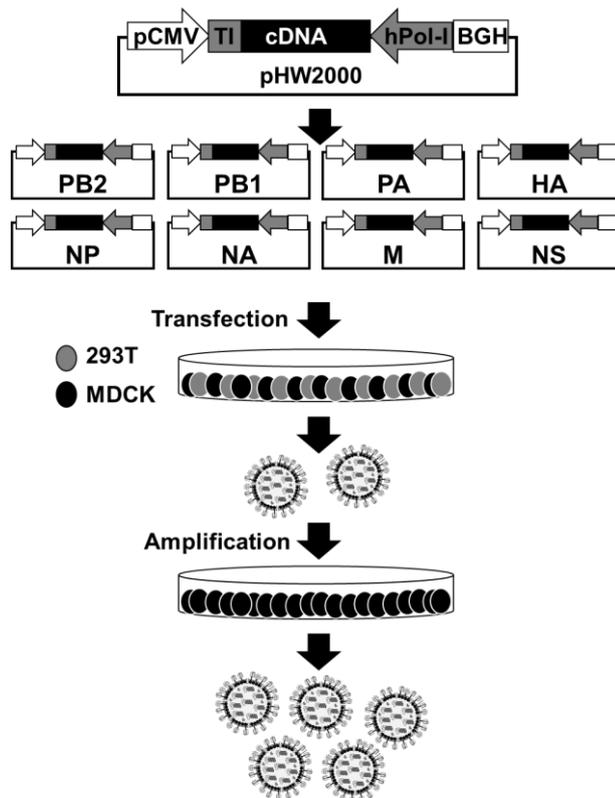
Ψ, packaging signals; numbers represent nucleotide positions in the negative sense (obtained from [www.fludb.org](http://www.fludb.org)).

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

**Proteínas bioluminiscentes:** Si bien las funciones de la bioluminiscencia no se conocen para todos los animales, generalmente la bioluminiscencia se usa para advertir o evadir a los depredadores, para atraer o detectar presas y para la comunicación entre miembros de la misma especie. En nuestro sistema, los genes reporteros servirán para visualizar y cuantificar las infecciones virales.

**Secuencia 2A de PTV-1:** Es un péptidos de 19 aminoácidos de longitud, que puede inducir un salto ribosómico durante la traducción de una proteína en una célula. La secuencia 2A es empleada por los picornavirus para producir diferentes proteínas/péptidos a partir de un mismo marco de lectura. En nuestro sistema esta secuencia será utilizada para producir la proteína viral NS1 (codificada en el segmento 8) fusionada al gen reportero.

- c) Descripción del método utilizado para la transformación: Los genes reporteros serán **amplificados mediante PCR e introducidos en el segmento 8 modificado que contienen la secuencia 2A.** Posteriormente, las células serán transfectadas con 8 plásmidos que codifican el genoma completo de IAV. Finalmente el virus será recuperado del sobrenadante celular y amplificado en células susceptibles a IAV, para generar un stock de trabajo.



- d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto: **Ya se ha descrito la función de cada proteína en la sección b y en la tabla anterior.**
- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto: **No aplica.**
- 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:

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. **Los análisis serán realizados una vez se obtenga el OMG. No obstante, se han realizado estudios similares anteriormente:**

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



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

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

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

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

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

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

8: Nogales A, Baker SF, Martínez-Sobrido L. Replication-competent influenza A viruses expressing a red fluorescent protein. *Virology*. 2015 Feb;476:206-216. doi: 10.1016/j.virol.2014.12.006. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25553516.

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

**Tabla 1. Resumen de los virus recombinantes que serán generados y características genotípicas.**

Virus recombinante	Segmento 1, 2, 3, 5, 7	Segmento 4 (HA)*	Segmento 6 (NA)	Segmentos 8 (NS)
PR8 H5N1	PR8	IAV H5N1	IAV H5N1	PR8
PR8/Nluc H5N1	PR8	IAV H5N1	IAV H5N1	PR8 NS-Nluc
PR8 H7N9	PR8	IAV H7N9	IAV H7N9	PR8
PR8/Nluc H7N9	PR8	IAV H7N9	IAV H7N9	PR8 NS-Nluc

\* Por motivos de seguridad, en el caso de H5 se eliminará el sitio de corte polibásico de la proteína HA (una modificación empleada en vacunas para H5N1, incluido vacunas para humanos), lo que da como resultado un crecimiento in vitro dependiente de tripsina.

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: **Genes internos de la cepa PR8 con la HA y NA procedentes de cepas H5N1 o H7N9. Asimismo, los genes reporteros y la secuencia 2A, también servirán como marcadores específicos.**
- 3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*): **Se espera que el OMG tenga la misma estabilidad genética que los virus de IAV aislados en la naturaleza.**
- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos: **El genoma de gripe está compuesto por 8 segmentos virales. En ocasiones cuando una misma célula se infecta con dos o más tipos de IAV, pueden surgir virus que contengan una composición genética distinta a los virus originales. Esta reorganización de segmentos, es común en virus con genomas segmentados. No obstante, la actividad se va a llevar a cabo en un laboratorio del CISA-INIA-CSIC, instalación con nivel de bioseguridad tipo 3. El OMG estará confinado a este espacio y no saldrá del mismo.**
- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: **PCR, secuenciación, western blot, técnicas de biología molecular, análisis de expresión de proteínas virales y del gen reportero, ensayos de neutralización, etc.**
  - b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: **No aplica.**

## 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  $10^6$  unidades formadoras de placa (PFU)/ ml.**



- b) Número de plantas:
  - c) Número de animales:
- 3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada: **5 años si se obtiene la financiación necesaria.**

*(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).*

- 4) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados: **Los brotes de gripe aviar del año 2021-2022 en Europa han hecho saltar las alarmas por la posible emergencia de nuevos virus pandémicos. Estos brotes fueron de especial relevancia porque afectaron a diferentes granjas y aves silvestres de toda España, y también por la aparición de casos en humanos en Europa y otras regiones. El objetivo de este proyecto es analizar la protección serológica basal de poblaciones de diferentes edades frente a los virus de gripe aviar A(H5N1) y A(H7N9), la respuesta a las vacunas antigripales estacionales y la relación de estos parámetros con la edad del paciente y el fenómeno del Pecado Original Antigénico (POA). En este proyecto colaborativo, construiremos virus recombinantes H5N1 y H7N9 con el backbone de A/PuertoRico8/1934 (H1N1) (PR8) que expresen o no la proteína NanoLuc (Luciferasa). Estos virus serán utilizados para realizar ensayos de inhibición de hemaglutinación (virus inactivado), y ensayos de microneutralización viral (virus vivo). Mediante estos ensayos conoceremos la cantidad y tipo de anticuerpos presentes antes de la vacunación que sean capaces de reconocer los virus aviares analizados, y la posterior respuesta humoral generada por las vacunas antigripales estacionales por respuestas heterotípicas. Adicionalmente, conoceremos si esta respuesta está condicionada por la edad del paciente, en relación con los virus que probablemente les primo-infectaron en la infancia y el fenómeno del POA. Finalmente, este proyecto permitirá conocer el grado de protección de la población, frente a una posible pandemia originada por gripe aviar.**

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

- 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*): **No está previsto el envío de virus vivos recombinantes generados a otras instituciones nacionales o internacionales. No obstante, no puede descartarse que en el futuro surjan futuras colaboraciones científicas que requieran el envío de alguno de los virus recombinantes generados a otras instituciones, con fines de investigación. En tal caso, 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 genética reversa (utilizando células MDCK/293) se amplifican en células de mamíferos MDCK. El virus obtenido del sobrenadante celular será centrifugado y almacenado a -80°C en alícuotas de trabajo perfectamente etiquetadas.**

**Ensayos de replicación y expresión en cultivos celulares: Células de mamíferos MDCK, serán infectadas a baja o alta multiplicidad de infección y los niveles de replicación serán determinados mediante ensayos de placa. Los niveles de expresión de proteínas serán evaluados mediante inmunofluorescencia o western blot utilizando anticuerpos específicos comerciales o sueros policlonales. Además, en el caso de los virus que expresen un gen reportero, también se evaluará la expresión del mismo. Finalmente, se realizarán ensayos de neutralización utilizando anticuerpos monoclonales o sueros policlonales. En estos casos los niveles de replicación viral o neutralización correlacionarán con la expresión de los genes reporteros. En todos los casos estamos muy familiarizados con este tipo de ensayos así como en la generación y caracterización de virus recombinantes de IAV utilizando técnicas de genética reversa.**

- 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.**

---

<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/>



Para llevar a cabo unas correctas medidas de seguridad, el Centro está diseñado siguiendo unos aspectos arquitectónicos, funcionales y buenas pautas de trabajo adecuados e integrados.

Dentro de los aspectos arquitectónicos y estructurales, el Centro está construido en hormigón armado hidrófugo, cuyo interior está pintado con pintura epoxídica para posibilitar las operaciones de descontaminación. Existen también ventanas blindadas de seguridad. Todas las entradas a boxes y diferentes zonas o laboratorios, así como las de emergencia, presentan de puertas con cerradura de seguridad y ajuste neumático.

El Centro presenta un modelo tipo “sandwich” donde las zonas de trabajo (laboratorios, animalario y entrada y salida de personal) se localizan en una planta intermedia.

En la planta superior se encuentra todo el sistema de filtración de Alta Eficacia del aire y la planta inferior está habilitada para los procesos de gestión de residuos sólidos y efluentes y para la entrada y salida de animales y material mediante sistemas SAS y Airlocks.

Para asegurar un funcionamiento correcto incluso bajo situaciones de emergencia, todos los dispositivos de seguridad se encuentran instalados de forma redundante (duplicados) o por triplicado.

Dentro de las características funcionales, se encuentran:

- El tratamiento del aire y ventilación estando Las condiciones termo-higrométricas se encuentran reguladas en todo momento. La humedad relativa se mantiene a niveles reducidos (35%) para así evitar que agentes biológicos aerotransportables queden fijados en codos y rugosidades del sistema de circulación del aire.

- Existe establecido en toda la zona Biocontenida, un mantenimiento de la presión negativa respecto a la atmosférica en gradiente diferencial unidireccional de flujo continuo en laboratorios y en cascada en boxes de experimentación de pasos de ente 25 y 35 Pa, generado en extracción dinámica, consiguiendo que el aire siempre circule de zonas teóricamente menos contaminadas a más contaminadas. El 100% del aire que entra vuelve a salir, en ningún momento se recircula aire.

- El aire de salida es filtrado mediante un sistema simple o doble seriado de filtros HEPA H14 (High efficiency Particulate Air) que consta de una malla filtrante con paso de poro de 99.995% para partículas de máximo poder de penetración en superficie (MPPS) (0.12  $\mu\text{m}$ -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 zona sólo puede acceder personal especialmente formado y autorizado para trabajar en estas condiciones. Una serie de vestuarios a la entrada y duchas a la salida aseguran la descontaminación obligatoria del personal. Cada persona que abandone el laboratorio deberá seguir escrupulosamente unas pautas de descontaminación entre las que se incluyen la obligación de descontaminación por arrastre y dilución gracias a la toma una ducha automática de agua de 3 minutos de duración. Bajo ningún concepto es posible extraer cualquier objeto de dentro del laboratorio sin la descontaminación pertinente.

• **Cumplimiento de procedimientos de trabajo y seguridad**

Resulta imprescindible por parte de los trabajadores, el cumplimiento de los procedimientos de trabajo (métodos, procedimientos normalizados de trabajo, instrucciones par aseguramiento de calidad, etc.) existentes y por lo tanto la información sobre los riesgos de los productos y operaciones, y las medidas de seguridad y protección a aplicar. Dentro de ellas, está especialmente controlado el uso obligatorio de equipos de protección individual (EPI), para evitar de forma accidental, inhalaciones, ingestiones, cortes, pinchazos, arañazos, mordeduras o picaduras cuando se enfrentan a situaciones especiales de riesgo biológico. Para ello el trabajador es formado, informado y acepta dejando constancia documental del cumplimiento de las normas y cuarentenas establecidas (se adjunta formato), destacando:

- Las normas que señalan la protección de las heridas y lesiones de las manos antes de iniciar la actividad laboral.
- Las normas que limitan o prohíben el trabajo directo con animales y/o manejo de equipos contaminados al personal que presenta lesiones cutáneas que no se pueden cubrir.
- La utilización constante de guantes de protección en la manipulación de muestras biológicas, objetos, materia o superficies contaminados con fluidos biológicos, etc.
- La prohibición de comer, beber, fumar, aplicarse cosméticos o llevar lentes de contacto en las áreas de trabajo.
- La obligación del uso de batas de protección, mascarillas y protección ocular (entre otras) en aquellas operaciones que pueden implicar salpicaduras de sangre o fluidos.
- El seguimiento estricto de las instrucciones que contemplan la actuación en caso de accidente o incidente en el que intervenga la presencia de un agente biológico.



- El seguimiento de la situación de riesgo adicional que podría suponer a aquellos trabajadores especialmente sensibles (patologías previas, trastornos inmunitarios, embarazo, lactancia, discapacidad, etc.).
- El uso de ropa de trabajo especial como pijamas, camisetas, monos, ropa interior, zuecos o zapatillas, botas, etc.
- El cambio de ropa en los accesos y salidas a la zona de alta seguridad.

De igual manera y en cumplimiento de la legislación vigente, los trabajadores que vayan a desarrollar cualquier actividad en la zona de Contención, se encuentran obligados a recibir formación para el desarrollo de sus tareas que incluyen los siguientes aspectos: agentes biológicos a los que están expuestos y grupo de riesgo al que pertenecen, prácticas de trabajo seguras, características y uso correcto de los equipos de protección individual [R.D. 664/1997].

- Establecimiento de cuarentenas

Finalmente y en cumplimiento de la legislación y normativa internacional de la OIE y la FAO, todo trabajador de la zona de Contención está sujeto a cuarentenas especiales 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.

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

- Inactivación de residuos en CSB mediante procedimientos normalizados.
- Inactivación de contenedores en las duchas de box.
- Autoclaves de doble frontera animalario/laboratorios y 2º interior NCB3/ exterior NCB3.
- Validaciones microbiológicas de todos los procesos de biodescontaminación por gas y calor mediante *Geobacillus stearothermophilus* en población de  $10^6$
- 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: **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). Todas las actividades se llevarán a cabo en laboratorios con nivel de biocontención 3 (NCB3 o BSL3).**

## **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 el Manual de Bioseguridad para trabajos con virus de la Influenza A (IAV) y Manual de Procedimientos Generales de Bioseguridad para trabajos con virus de la Influenza A (IAV). 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 curso de reciclaje en bioseguridad.**

- 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.**

## **X. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS**

- 1) Encargado de la gestión de residuos:

- |                                     |    |                                     |    |                          |
|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|--------------------------|
| a) gestión interna:                 | SÍ | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| b) gestión por una empresa externa: | SÍ | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |

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

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

**In situ: Solidos:**

**Dos ciclos por autoclave de vapor 134°C - 18 minutos**

**Tratamiento químico superficial por ducha química o gas en SAS o Airlocks**

**Tratamiento químico por inmersión en Dunk Tank**

**Líquidos:**

**Tratamiento termo-químico de efluentes**

**Aire:**

**Filtración HEPA H14 simple o doble seriada.**

**Descontaminación por inyección de gas (formaldehído o peróxido de hidrógeno gas) antes de su retirada de caja.- Sistema adicional bag in – bag out**



**2º Tratamiento del filtro por autoclave de vapor antes de su salida del NCB3.**

**Exterior: Una vez tratados “in situ”, retirada de vidrio y en su caso de residuos biosanitarios especiales o clase II por gestor acreditado para tratamiento en incineración o autoclave de vapor.**

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

- 1) Condiciones en las que podría producirse un accidente: **Indicadas en Plan de Evacuación**
- 2) Equipamiento de seguridad (especifíquese): **Reflejados en procedimientos específicos para el virus de la gripe.**
- 3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores: **Manual de bioseguridad para IAV, plan de Evacuación, Procedimientos de Bioseguridad específicos para el virus de la gripe (laboratorio y 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-INIA/CSIC); Centro Nacional Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC); Ministerio de Ciencia e Innovación**  
Dirección postal: **Carretera de Algete a El Casar de Talamanca s/n; Valdeolmos - Alalpardo; 28130 Madrid.**
- 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: **Aitor Nogales González**  
NIF: **51986340S**  
Cargo: **Científico titular CSIC**  
Tel: **91 6202300**  
Fax: **91 6202247**  
Correo electrónico: **nogales.aitor@inia.csic.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.csic.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: Los brotes de gripe aviar del año 2021-2022 en Europa han hecho saltar las alarmas por la posible emergencia de nuevos virus pandémicos. Estos brotes fueron de especial relevancia porque afectaron a diferentes granjas y aves silvestres de toda España, y también por la aparición de casos en humanos en Europa y otras regiones. El objetivo de este proyecto es analizar la protección serológica basal de poblaciones de diferentes edades frente a los virus de gripe aviar A(H5N1) y A(H7N9), la respuesta a las vacunas antigripales estacionales y la relación de estos parámetros con la edad del paciente y el fenómeno del Pecado Original Antigénico (POA). En este proyecto colaborativo, construiremos virus recombinantes H5N1 y H7N9 con el backbone de A/PuertoRico8/1934 (H1N1) (PR8) que expresen o no la proteína NanoLuc (Luciferasa). Estos virus serán utilizados para realizar ensayos de inhibición de hemaglutinación (virus inactivado), y ensayos de microneutralización viral (virus vivo). Mediante estos ensayos conoceremos la cantidad y tipo de anticuerpos presentes antes de la vacunación que sean capaces de reconocer los virus aviáres analizados, y la posterior respuesta humoral generada por las vacunas antigripales estacionales por respuestas heterotípicas. Adicionalmente, conoceremos si esta respuesta está condicionada por la edad del paciente, en relación con los virus que probablemente les primo-infectaron en la infancia y el fenómeno del POA. Finalmente, este proyecto permitirá conocer el grado de protección de la población, frente a una posible pandemia originada por gripe aviar.**

**Cabe destacar que los virus que se generarán ya existen en otros laboratorios, y por tanto no se prevé ningún problema en su generación, manipulación o seguridad. Aunque el uso del virus A/PuertoRico8/1934 (H1N1) (PR8) se clasifica como actividad de tipo 2, la incorporación en el mismo de genes procedentes de gripe aviar, implica que la actividad se clasifique como de tipo 3.**

- 1) **Duración prevista de la actividad: 5 años si se obtiene la financiación necesaria. Actualmente se ha solicitado financiación para estos estudios a entidades nacionales e internacionales (Como EEUU). Por tanto la duración de los estudios, que inician una nueva línea de investigación, estará ligada a la obtención de financiación durante estos 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 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 de la gripe, virus de la Influenza A o Influenza A virus (IAV). La cepa de IAV A/PuertoRico8/1934 (H1N1).**

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

**Organismo donante: genes de IAV H5N1 y H7N9 (sintetizados por una empresa del sector) y NanoLuc luciferasa (obtenida por PCR de un plásmido).**

**Organismo receptor: La cepa de IAV A/PuertoRico8/1934 (H1N1).**

**OMGs: Nuevos virus recombinantes de IAV serán generados mediante técnicas de genética reversa, ya establecidas en el campo. Algunos de los virus recombinantes también expresarán la luciferasa Nanoluc como un gen reportero para seguir la infección de células (Tabla 1). En este proyecto colaborativo, construiremos virus recombinantes que contengan los genes H5N1 y H7N9 con el backbone o los otros 6 segmentos virales de A/PuertoRico8/1934 (H1N1) (PR8) que expresen o no la proteína NanoLuc (Luciferasa).**

**Tabla 1. Resumen de los virus recombinantes que serán generados y características genotípicas.**

Virus recombinante	Segmento 1, 2, 3, 5, 7	Segmento 4 (HA)*	Segmento 6 (NA)	Segmentos 8 (NS)
PR8 H5N1	PR8	IAV H5N1	IAV H5N1	PR8
PR8/Nluc H5N1	PR8	IAV H5N1	IAV H5N1	PR8 NS-Nluc
PR8 H7N9	PR8	IAV H7N9	IAV H7N9	PR8
PR8/Nluc H7N9	PR8	IAV H7N9	IAV H7N9	PR8 NS-Nluc

\* Por motivos de seguridad, en el caso de H5 se eliminará el sitio de corte polibásico de la proteína HA (una modificación empleada en vacunas para H5N1, incluido vacunas para humanos), lo que da como resultado un crecimiento in vitro dependiente de tripsina.



La infección por IAV o gripe produce enfermedad respiratoria o gastrointestinal de mayor o menor gravedad dependiendo del subtipo de virus, la especie infectada, y el estado de salud del sujeto infectado. La infección también puede ser asintomática. IAV causa una infección contagiosa que se caracteriza por la aparición de fiebre, pudiendo ir acompañada de escalofríos, sudoración, cefaleas, dolores musculares, astenia, anorexia, conjuntivitis y/o síntomas respiratorios (congestión nasal, dolor de garganta, tos seca). Pueden producirse complicaciones respiratorias (neumonía, bronquitis, sobreinfecciones bacterianas broncopulmonares, sinusitis), auditivas (otitis), y menos frecuentemente cardiovasculares o neurológicas. También puede producirse deshidratación y empeoramiento de condiciones médicas crónicas preexistentes, como asma, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), fibrosis quística, o diabetes. No obstante la cepa PR8 se considera avirulenta en humanos. Además es la cepa de virus que se utiliza para el desarrollo de las vacunas inactivadas para proteger a la población frente a IAV estacional.

- b) Organismo donante. Genes de IAV H5N1 y H7N9 y NanoLuc luciferasa. Ver también apartado a para más detalles.

-IAV.

-Proteína luminiscente NanoLuc: nanoLuc es una proteína bioluminiscente derivada de *Oplophorus gracilirostris*.

- Secuencia 2A del teschovirus porcino 1 (porcine teschovirus 1; PTV-1).  
Taxonomía: Familia: Picornaviridae. Género: Teschovirus.

Los genes sintéticos de IAV serán producidos por la empresa Biomatik o GenScript. Los genes reporteros serán obtenidos mediante PCR de plásmidos comerciales (pNL1.1-Nluc; Promega #N1001).

- c) Inserto. Ver también apartado a para más detalles.

**Segmentos del genoma de IAV:** Dichos segmentos/genos codifican para las diferentes proteínas virales de IAV y tienen las mismas funciones.



Influenza A virus proteins and their functions

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

[Open in a separate window](#)

N<sup>o</sup>, influenza virus segment number

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

**En el caso de los genes reporteros no se ha descrito un papel en patogénesis y serán obtenidos mediante PCR utilizando como molde un plásmido comercial.**

**PTV-1, del que solo se usará una secuencia de 19 aminoácidos, es un virus que afecta principalmente a cerdos. La infección por PTV puede ser subclínica o causar encefalomielitis y enfermedad grave o leve. La PTV se ha asociado en algunos casos con diarrea, neumonía, pericarditis y miocarditis. No se ha descrito que la secuencia 2A utilizada sea un factor de virulencia por si solo o fuera del contexto de PTV-1**

d) Vector.

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

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



**-Plásmidos que contienen los genes reporteros. (pNL1.1-Nluc; Promega #N1001).**

- e) Organismo modificado genéticamente resultante. *Ver apartado a para más detalles.*

**Tabla 1. Resumen de los virus recombinantes que serán generados y características genotípicas.**

Virus recombinante	Segmento 1, 2, 3, 5, 7	Segmento 4 (HA)*	Segmento 6 (NA)	Segmentos 8 (NS)
PR8 H5N1	PR8	IAV H5N1	IAV H5N1	PR8
PR8/Nluc H5N1	PR8	IAV H5N1	IAV H5N1	PR8 NS-Nluc
PR8 H7N9	PR8	IAV H7N9	IAV H7N9	PR8
PR8/Nluc H7N9	PR8	IAV H7N9	IAV H7N9	PR8 NS-Nluc

\* Por motivos de seguridad, en el caso de H5 se eliminará el sitio de corte polibásico de la proteína HA (una modificación empleada en vacunas para H5N1, incluido vacunas para humanos), lo que da como resultado un crecimiento in vitro dependiente de tripsina.

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

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

**El virus de la Influenza, dependiendo del subtipo o cepa infecta un amplio espectro de especies de mamíferos (incluyendo humanos, cerdos, caballos, perros, etc) y aves. No obstante la cepa PR8 se considera avirulenta en humanos, y solo es patogénica en algunos modelos de ratón de laboratorio. Además es la cepa de virus que se utiliza para el desarrollo de las vacunas inactivadas para proteger a la población frente a IAV estacional. Los Subtipos H5N1 y H7N9 infectan aves silvestres y de corral, pudiendo ser la mortalidad en estas últimas muy alta. No obstante, dado que se usan los genes internos de PR8, el virus también sería prácticamente avirulento en aves. Además será eliminado el dominio polibásico de la HA del subtipo H5N1, el cual es uno de los principales determinantes de patogenicidad en aves y mamíferos.**

**La infección por IAV se puede manifestar: Asintomático, enfermedad respiratoria o gastrointestinal principalmente. IAV causa una infección contagiosa que se caracteriza por la aparición de fiebre, pudiendo ir acompañada de escalofríos, sudoración, cefaleas, dolores musculares, astenia, anorexia, conjuntivitis y/o síntomas respiratorios (congestión nasal, dolor de garganta, tos seca). Pueden producirse complicaciones respiratorias (neumonía, bronquitis, sobreinfecciones bacterianas broncopulmonares, sinusitis), auditivas (otitis), y menos frecuentemente cardiovasculares o neurológicas. También puede producirse deshidratación y empeoramiento de condiciones médicas crónicas preexistentes, como asma, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), fibrosis quística, o diabetes. No obstante la cepa PR8 se considera avirulenta en humanos. Además es la cepa de virus que se utiliza para el desarrollo de las vacunas inactivadas para proteger a la población frente a IAV estacional.**



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

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

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 OMGs y los estudios en los que se van a utilizar 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 del CISA-INIA-CSIC, instalación con nivel de bioseguridad tipo 3. El OMG estará confinado a este espacio y no saldrá del mismo.**

**El riesgo de contaminación indoor out door es prácticamente inexistente. El nivel de biocontención aplicado excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.**

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

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

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



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

- b) Concentración y escala utilizadas. **Se utilizarán en los distintos ensayos aproximadamente 30 ml de los OMG a una concentración de  $10^6$  unidades formadoras de placa (PFU) /ml.**

**Ensayos de replicación y expresión en cultivos celulares, ensayos de neutralización. Células de mamíferos MDCK, serán infectadas a baja o alta multiplicidad de infección y los niveles de replicación o expresión de proteínas y neutralización serán determinados.**

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

- 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 o animal 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 ZEPA.**

**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.**



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

- 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.

**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.**