



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

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad **IRTA-CReSA (Institut de Recerca i Tecnologia
Agroalimentàries)**

Nombre:

Dirección postal: **Torre Marimon, Crt C-59 km 12,1; 08140, Caldes de Montbui**

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: **Josep Usall Rodié**

NIF: **40.893.753-Y**

Cargo: **Director General**

Tel: **934.674.040**

Fax: **934.674.042**

Correo electrónico: josep.usall@irta.cat

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: **Fernando Rodriguez González**

NIF: **13.763.889-E**

Cargo: **Investigador**

Tel: **(+34) 93.467.40.40 Ext. 1771**

Fax: **(+34) 93.581.44.90**

Correo electrónico: fernando.rodriguez@irta.cat

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

Nombre y apellidos: **Xavier Abad Morejón de Girón**

NIF: **35.082.196-C**

Cargo: **Jefe de la Unidad de Biocontención y Laboratorios NBS2**

Tel: **(+34) 93.467.40.40 Ext. 1712**

Fax: **(+34) 93.581.44.90**

Correo electrónico: xavier.abad@irta.cat

e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: **Xavier Abad.**

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



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

SI NO

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

-Nombre de la convocatoria:

-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: **27 mayo 2016.**

b) Número de referencia del expediente: **A/SE/16/ I-06.**

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad: **Los objetivos de la actividad son 1) evaluar la eficacia de un prototipo vacunal frente a PPA administrado por vía intranasal a dosis baja, esperando que la vacuna proteja eficazmente frente a una infección con una cepa virulenta de PPA, y 2) evaluar la diseminación de vacuna entre los animales.**

2) Clasificación de la actividad:

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

Tipo 1

Tipo 2

Tipo 3

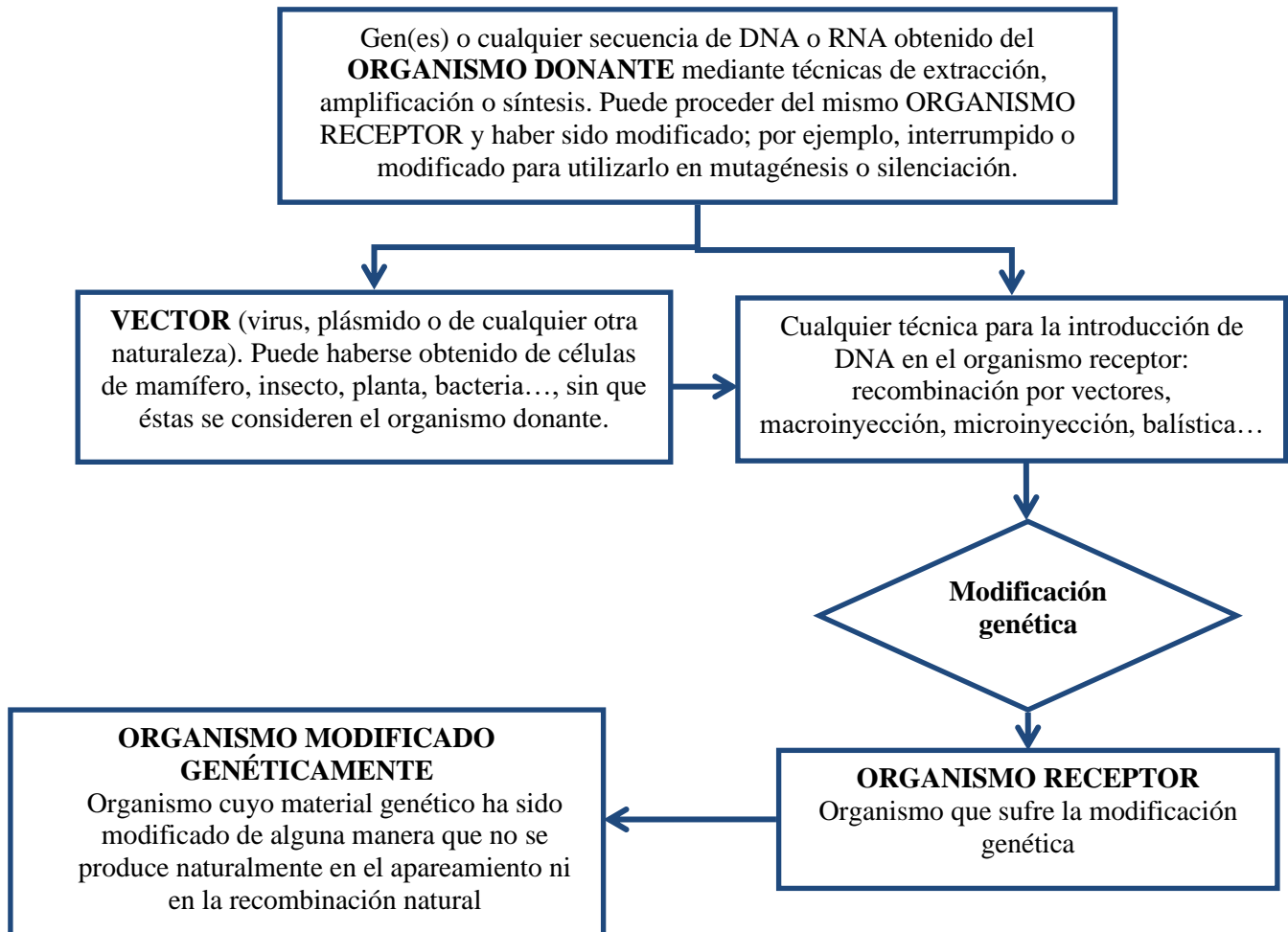
Tipo 4

¹TASAS

Están exentos del pago de la tasa los casos en los que se cumplan dos requisitos, que la actividad se realice en el marco de los Planes Estatales de Investigación Científica y Técnica y de Innovación; y que se desarrolle por una institución, ente u órgano público.



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





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

1) Nombre científico: **VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) - cepa BA71**

Taxonomía: **Familia *Asfarviridae*, género *Asfivirus***

Nombre común: **Virus de la Peste Porcina Africana**

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento: **La cepa BA71 fue aislada en 1971 en Badajoz (España). Se cultiva en macrófagos alveolares porcinos (MAPs), línea celular primaria, aislados de pulmones de cerdo. El aislamiento del OMG se realizó mediante consecutivas rondas de purificación y clonaje en cultivo celular. El estoc de virus vacunal (OMG) se mantiene mediante pases en células COS-7 (ATCC® CRL-1651™).**

b) Técnicas de identificación: **PCR, Presencia de hemadsorción viral.**

c) Marcadores genéticos: **proteínas p72 o p52.**

d) Marcadores fenotípicos: **No aplica.**

e) Estabilidad genética: **el virus es estable a largo plazo.**

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores: **no constan.**

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:

Patógeno en *Sus scrofa*, de forma dosis-dependiente.

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

a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

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

SI NO

Porqué:



7) La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?
No aplica.

8) Experiencia adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor:
Dependiendo de la dosis administrada se puede observar virulencia.

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

a) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?: **Sí**

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo: **No**

- | | | |
|------|---|--------------------------|
| 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: es un virus y no produce ninguna estructura como las aquí citadas. | |

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

Otros factores que pueden afectar a la capacidad de supervivencia son la temperatura, la humedad relativa y el pH. El VPPA es resistente a bajas temperaturas, pero se ha visto que el virus se inactiva a 56°C durante 70 min o 60°C durante 20 minutos. El virus en aerosoles no es viable cuando la humedad relativa está por encima del 50%. También se ha observado inactivación del virus a pH <3.9 o >11.5.

REFERENCIAS:

- https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/AFRICAN_SWINE_FEVER.pdf
- **Kalmar ID, Cay AB, Tignon M. Sensitivity of African swine fever virus (ASFV) to heat, alkalinity and peroxide treatment in presence or absence of porcine plasma. Vet Microbiol. 2018;219:144-149. doi:10.1016/j.vetmic.2018.04.025**
- **W. Plowright & J. Parker. The stability of African swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. Arch Gesamte Virusforsch. 1967;21(3):383-402. doi: 10.1007/BF01241738.**



- **Donaldson AI, Ferris NP. The survival of some air-borne animal viruses in relation to relative humidity. Veterinary Microbiology. 1976;1(4):413-420.**

d) Posibles nichos ecológicos:

Cerdos, jabalíes, garrapatas del género *Ornithodoros* y cerdos salvajes africanos (facóqueros, etc.) y carcasas de animales muertos a causa de la PPA.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

Si un animal es infectado, empezará a mostrar síntomas a partir de aproximadamente el día 4 post-infección.

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

No presenta ninguna implicación en procesos ambientales.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Si infecta un cerdo doméstico o un jabalí, este podría reproducir la enfermedad.

Por otro lado, no se esperan interacciones con otros organismos en el medio ambiente ni tampoco ningún efecto en ningún otro organismo (a parte del modelo experimental a utilizar). Los experimentos se realizarán en instalaciones de bioseguridad de nivel 3 (BSL3) para eliminar cualquier probabilidad de que los virus se diseminen en el ambiente.

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

El agente se encuentra, de forma natural, en diversos países de África Subsahariana. En territorio europeo, se encuentra en algunos países del este de Europa (y también en Bélgica, Grecia, Alemania, Italia continental y Cerdeña). En Asia se puede encontrar en China, Vietnam, Laos, Corea, entre otros.

12) Hábitat natural del organismo:

Cerdos, jabalíes, garrapatas blandas del género *Ornithodoros* y cerdos salvajes africanos.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: *Escherichia coli*

Taxonomía: **Dominio: *Bacteria***
Filo: *Proteobacteria*
Clase: *Gammaproteobacteria*
Orden: *Enterobacterales*
Familia: *Enterobacteriaceae*
Género: *Escherichia*
Especie: *Escherichia coli*



Nombre común: E. coli

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: **ADN gen β -glucuronidasa (gen 'reporter')**.

3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in Vitro*

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

El gen codifica para la enzima β -glucuronidasa. Esta enzima cataliza la X-glucosa (5-brom-4-chloro-3-indolyl glucuronide) y da un color azul. Esto facilita el aislamiento de los virus recombinantes.

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

SI NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i) seres humanos

ii) animales

iii) plantas

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

No aplica.

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

No.

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

No.



V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

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

2) Finalidad de la modificación genética:

La finalidad de la modificación es la reducción de la patogenicidad del VPPA para permitir la inducción de una respuesta inmune protectora en los cerdos. Se quiere conferir capacidad protectora para utilizarlo como una vacuna viva atenuada (*live attenuated vaccine, LAV*).

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

Recombinación homóloga.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:

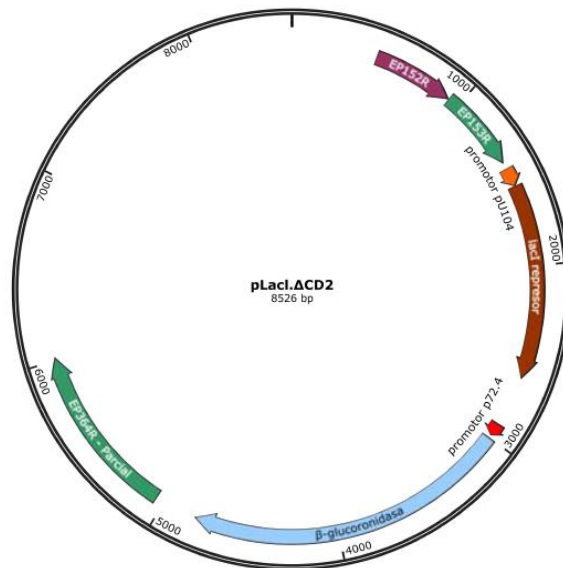
Plásmido pLacIΔCD2

b) Si se trata de un virus:

Es defectivo en replicación SÍ NO

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

Virus recombinante con la delección del gen EP402R (que codifica la proteína CD2v) y el gen gusA inserido en su lugar. El plásmido contiene los genes virales EP152R y EP153R por un lado, y el gen EP364R que direccionan donde debe producirse la recombinación homóloga en el virus.



d) Gama de hospedadores del vector:

E. coli

e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No aplica.

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

No aplica.

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

No.

5) Información del inserto:

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

Secuencia del gen gusA:

**ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGAC
GGCCTGTGGGCATTCAGTCTGGATCGCGAAAACCTGTGGAATTGATCA
GCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGC
CAGGCAGTTTTAACGATCAGTTCGCCGATGCAGATATTCGTAATTATG
TGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAGGTTGG
GCAGGCCAGCGTATCGTGCTGCGTTTCGATGCGGTCCTCATTACGG
CAAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTGATGGAGCATCAGGGCGGCT
ATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGTATGTTATTGCCGGGAAAA
GTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAACTGAACTGGCAGACTA
TCCCGCCGGGAATGGTGATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAAAGCAG
TCTTACTTCCATGATTTCTTAACTACGCCGGGATCCATCGCAGCGTA**



ATGCTCTACACCACGCCGAACACCTGGGTGGACGATATCACCGTGGT
GACGCATGTTCGCGCAAGCCTGTAACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGG
TGGTGGCCAATGGTGATGTCAGCGTTGAACTGCGTGATGCGGATCAA
CAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACCAGCGGGACTTTGCAAGTGGT
GAATCCGCACCTCTGGCAATCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAACTGTG
CGTCACAGCCAAAAGCCAGACAGAGTGTGATATCTACCCGCTGCGCG
TCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAGTTCCTGATCAAC
CACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGCCGTCATGAAGATGCGGAT
TTGCGCGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGATCACGC
ATTAATGGACTGGATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCC
TTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGCATCGTGG
TGATTGATGAACTGCAGCTGTTCGGCTTTAACCTCTCTTTAGGCATTG
GTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAAGAACTGTACAGCGAAGAGGCA
GTCAACGGGGAAACTCAGCAGGCGCACTTACAGGGCGATTAAAGAGCT
GATAGCGCGTGACAAAACCACCCAAGCGTGGTGATGTGGAGTATTG
CCAACGAACCGGATACCCGTCCGCAAGGTGCACGGGAATATTTGCGG
CCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCCGACGCGTCCGATCAC
CTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGA
TCTCTTTGATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCA
AAGCGGCGATTTGGAAACGGCAGAGAAGGTACTGGAAAAAGAACTTC
TGGCCTGGCAGGAGAAACTGCATCAGCCGATTATCATCACCGAATAC
GGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATGTG
GAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCGTCTT
TGATCGCGTCAGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTTGCGCG
ATTTTGCGACCTCGCAAGGCATATTGCGCGTTGGCGGTAACAAGAAG
GGCATCTTCACCCGCGACCGCAAACCGAAGTCGGCGGCTTTTCTGCT
GCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAACCGCAGCAGG
GAGGCAAACAATGA

- b) Origen y función específica de cada parte del inserto:
La incorporación del gen gusA es necesaria para poder seleccionar los clones virales que contienen la delección deseada y el gen gusA en su lugar. Añadiendo el sustrato para la proteína para la que codifica el gen gusA (usamos 5-brom-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-glucosa)) se visualizan los clones de color azul para facilitar el aislamiento de los virus recombinantes.
- c) Descripción del método utilizado para la transformación:
Transfección química en células COS.
- d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:
No aplica.
- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:
Promotor vírico p72 controlando la expresión del gen 'reporter'.
- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?



Sí.

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)

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

a) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese:
No.



- b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción?
En caso afirmativo, especifíquese:
No.
- c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar:
Sí, a las dosis ensayadas, no produce la enfermedad en cerdo.
- 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 aplica.
- f) Marcadores específicos del OMG:
Gen 'reporter' gusA.
- 3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):
Es estable a largo plazo.
- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos:
No.
- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:
PCR, secuenciación.
- b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:
No aplica. El OMG se usará únicamente en las instalaciones de alta seguridad biológica del IRTA-CReSA por lo que no habrá liberación voluntaria en el medio ambiente.

Más información sobre el GMO:

Lopez, E.; Bosch-Camós, L.; Ramirez-Medina, E.; Vuono, E.; Navas, M.J.; Muñoz, M.; Accensi, F.; Zhang, J.; Alonso, U.; Argilagué, J.; Salas, M.L.; Anachkov, N.; Gladue, D.P.; Borca, M.V.; Pina-Pedrero, S.; Rodríguez, F. Deletion Mutants of the Attenuated Recombinant ASF Virus, BA71 Δ CD2, Show Decreased Vaccine Efficacy. *Viruses* 2021, *13*, 1678. <https://doi.org/10.3390/v13091678>

Monteagudo PL, Lacasta A, López E, Bosch L, Collado J, Pina-Pedrero S, Correa-Fiz F, Accensi F, Navas MJ, Vidal E, Bustos MJ, Rodríguez JM, Gallei A, Nikolin V, Salas ML, Rodríguez F. BA71 Δ CD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities. *J Virol.* 2017 Oct 13;91(21):e01058-17. doi: 10.1128/JVI.01058-17. PMID: 28814514; PMCID: PMC5640839.



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:

Virus vacunal (OMG): 2mL por animal (vía intranasal). Volumen total: 28mL

- **16mL para el grupo dedicado a evaluar la eficacia (8 animales x 2mL)**
- **12mL para el grupo dedicado a evaluar la transmisión (6 animales x 2mL)**

**Virus wild type virulento para el desafío: 1mL por animal (vía intramuscular).
Volumen total 4mL (1mL para cada animal Troyano).**

**El diseño de estudio está descrito en la sección VII. 4)*

b) Número de plantas:

No aplica.

c) Número de animales:

Total 36 cerdos.

- **24 animales para estudiar la eficacia divididos en 3 grupos: grupo no vacunado (8 animales); grupo vacunado (8 animales); animales troyanos para realizar el desafío por contacto (8 animales, 4 se mezclan con el grupo vacunado y 4 con el grupo no vacunado).**
- **12 animales para estudiar la transmisión del virus vacunal: 6 animales vacunados; 6 animales no vacunados.**

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

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

El proyecto empezará en octubre-noviembre 2022 y según el número de pasajes que se tengan que hacer existe la posibilidad de que haya que acabar de hacer los últimos pasajes a mediados de 2023 (según disponibilidad de boxes en las instalaciones NBS3 del CReSA).

La duración de cada pasaje (del primero al cuarto) es de dos semanas entre inoculación y sacrificio. La duración del 5º pasaje y el estudio de seguridad adicional será de 21 días.

4) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados: El objetivo de este proyecto es evaluar la seguridad de un prototipo vacunal frente a PPA administrado por vía intranasal esperando que la vacuna no cause reversión a la virulencia.



Los objetivos de este proyecto son 1) evaluar la eficacia de un prototipo vacunal frente a PPA administrado por vía intranasal a dosis baja, esperando que la vacuna proteja eficazmente frente a una infección por una cepa virulenta de PPA, y 2) evaluar la diseminación de vacuna entre los animales.

Ambos objetivos se evaluarán en paralelo puesto que se trata de la misma vacuna, que interesa realizarlo en animales del mismo lote y origen para que los resultados en cuanto a respuesta inmunitaria sean comparables.

Se seguirá el siguiente diseño:

36 animales de 4 semanas de vida se transportarán de la granja de origen hasta las instalaciones de CReSA. Se distribuirán en 3 boxes y se llevará a cabo un período de aclimatación de 2 semanas. La distribución será la siguiente:

- Grupo 1: 8 animales vacunados a una dosis de 10^4 PFU/mL, ubicados en el box A, para estudiar la eficacia.
- Grupo 2: 8 animales no vacunados, ubicados en el box B, para estudiar la eficacia.
- Grupo 3: 8 animales no vacunados, que serán infectados intramuscularmente con el virus de desafío (Georgia 07) a 10^3 GEC/mL, que servirán como animales troyanos para el desafío por contacto de los animales de los grupos 1 y 2. Se ubicará 4 animales en el box A y 4 en el box B. Estos animales estarán separados durante el período de vacunación de los otros grupos (1 y 2, respectivamente) mediante unas vallas haciendo que dentro del box haya dos corrales independientes para evitar el contacto entre grupos antes del desafío.
- Grupo 4: 6 animales vacunados a una dosis de 3.3×10^4 PFU/mL, ubicados en el box C, para estudiar la transmisión de vacuna.
- Grupo 5: 6 animales no vacunados, ubicados en el box C, para estudiar la transmisión de vacuna.

Después de 2 semanas de aclimatación a día de inicio del estudio (D0) Se inmunizarán a los animales de los grupos vacunados: grupo 1 (2mL, IN, 10^4 PFU/mL) y grupo 4 (2mL, IN, 3.3×10^4 PFU/mL). El grupo 2 recibirá 2mL IN de PBS.

El día de vacunación, los animales del grupo 5 se aislarán en el box C para evitar que reciban vacuna de forma accidental. Al día siguiente, volverán a juntarse con los animales del grupo 4 para ver la transmisión de vacuna.

3 semanas después de la vacunación (D21), se infectarán a los animales troyanos del grupo 3, tanto los del box A como los del box B (1mL, IM, 10^3 GEC/mL Georgia 07). Al día siguiente (SD22) se mezclarán los animales dentro de cada box (box A: grupo 1 y grupo 3; box B: grupo 2 y grupo 3) y se realizará el desafío por contacto de los animales de los grupos 1 y 2. Una semana más tarde (D28) los animales del grupo 3 se sacrificarán (si desarrollan la enfermedad antes del D28, se sacrificarán según criterio de punto final).

4 semanas después del desafío (D49) se eutanasiarán los animales del grupo 1 y 2 para obtener muestras de tejidos.

Los animales de los grupos 4 y 5 se mantendrán el contacto hasta D49, día de fin del estudio, donde se eutanasiarán y se obtendrán muestras de tejidos para ver la diseminación del virus vacunal.



Semanalmente se obtendrán muestras de sangre (y suero), hisopos nasales e hisopos rectales de todos los animales (grupos 1, 2, 4 y 5) para ver la respuesta inmunitaria y los niveles de virus en cada uno de los animales (ELISA y qPCR).

Para evaluar la transmisión de vacuna (box C, grupos 4 y 5) también se obtendrán semanalmente muestras ambientales para analizar la presencia de virus vacunal.

Si los resultados obtenidos son positivos (la dosis baja es eficaz, y la dosis media produce una transmisión/diseminación segura), se seguirá con el desarrollo del candidato vacunal. Si los resultados son negativos, es posible que se detenga este desarrollo y se busquen otros prototipos más seguros y eficaces.

- 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 virus vacunal (Ba71ΔCD2) se produjo bajo BPMs en Huvepharma EEOOD (3A Nikolay Haytov St, 5th Floor, Sofia 1113. Bulgaria).

- 6) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo en virtud de la legislación aplicable² (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*):

La cepa modificada genéticamente está almacenada en el centro IRTA-CReSA en la unidad de NBS3, por tanto, no es necesario ningún transporte.

- 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*):

VIRUS VACUNAL y WT (para el desafío):

El stock de virus vacunal Ba71ΔCD2 y de virus WT Georgia07 se manipularán en cabinas de seguridad biológica de los laboratorios NBS3 (tal y como se describe en el punto 8) y se transportará a estabulario, sin abandonar Biocontención, en contenedores apropiados.

MUESTRAS OBTENIDAS DURANTE LA FASE EXPERIMENTAL IN VIVO:

Se obtendrán las siguientes muestras infectadas:

² Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- **(ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas)** del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones
- **Reglamento (CE) n° 1/2005** del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas 64/432/CEE y 93/119/CE y el Reglamento (CE) n° 1255/97.
- **Reglamento (CE) n° 1946/2003** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente [Diario Oficial L 287 de 5.11.2003].
- **Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad.** Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: <https://bch.cbd.int/protocol/>



- Muestras de tejidos al finalizar el estudio que serán guardadas (congeladas a -75°C). En caso de que se considere conveniente estas muestras se analizarán para VPPA mediante qPCR.
- Muestras de sangre e hisopos nasales/rectales obtenidas durante la fase experimental. Las sangres obtenidas durante el estudio serán analizadas para VPPA mediante ELISA para estudiar la respuesta humoral y qPCR para ver la carga viral. Los hisopos serán analizados por qPCR para estudiar la excreción de virus.
- Muestras ambientales: obtención de hisopos de tierra/paredes del box y muestras de heces de tierra para estudiar la diseminación de virus (mediante qPCR).

Las muestras de animales infectados se manipularán en cabinas de seguridad biológica de los laboratorios NBS3 (tal y como se describe en el punto 8) y se transportarán de estabulario a laboratorio en contenedores apropiados.

La centrifugación se realiza utilizando cestas con tapa cerradas herméticamente para prevenir derrames y aerosoles, y se abren dentro de cabinas de bioseguridad. Las superficies de trabajo son desinfectadas con Virkon 1% y Etanol 70%, de forma secuencial.

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

En CReSA NBS3:

Confinamiento primario: Cabinas de seguridad biológica (CSB); por ejemplo, CSB BIOSTAR CR-0247 y CR-0250 (a Virología CR / 1032); CSB BIOSTAR CR-0246 y CR-0245 (Cultivo Celular, CR / 1031); CSB BIOSTAR CR-0248 y BIO-IIA / P CR-0249 (a Bacteriología CR / 1033); la CSB NUAIRE CR-1450 (a Biología Molecular CR / 1035) donde pueden ser hechas las manipulaciones de las muestras infecciosas. Todas las CSB están sometidas a una verificación anual por empresa externa.

Centrífugas eppendorf 5810R, con rotores basculantes y cestos provistos de tapas herméticas con n / s 0.032.681 (CR-0271), n / s 0.032.680 (CR-0272), y n / s 0.032.682 (CR-0273). Verificación anual de su velocidad por empresa externa.

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

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

No hay fuentes de peligro potenciales que puedan afectar a la actividad, aunque sea indirectamente; ni centrales eléctricas ni nucleares, embalses, ni instalaciones militares,



ni objetivos estratégicos. No hay ríos cercanos que puedan salir de su cauce, ni bosques cercanos que puedan quemarse afectando al edificio.

- 2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:
Clima mediterráneo sin efectos graves sobre la actividad de la instalación. Por su diseño y ubicación, en una pendiente, el riesgo de inundación es mínimo. La insolación intensa en verano puede afectar a Laboratorios NBS2 incrementando el gasto de energía en mantener condiciones de trabajo pero tiene efecto escaso, nulo sobre la Unidad de Alta Biocontención, mucho menos expuesta. Situaciones de sequía prolongada con cortes de suministro pueden ser tamponados por la instalación de Alta Biocontención que cuenta con dos depósitos con decenas de miles de litros de capacidad total.

- 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:
Laboratorio de Cultivo Celular y Virología, y Equipos (salas CR/1031, CR/1032 y CR/1034, respectivamente) y Boxes experimentales a asignar, de la Unidad de Alta Biocontención del CReSA (instalación autorizada por el trabajo con OMG de tipo 3 (A / SE / 16 / I-06)).

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

- 1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:
El *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (CReSA) está certificado en Buenas Prácticas de Laboratorio por la Generalitat de Catalunya (Departament de Salut) desde el año 2009, con diversas renovaciones. El certificado actual tiene la referencia BPL/2001/001/CAT (17/gener/2020).

- 2) Formación del personal adscrito:
El personal experimental adscrito tiene experiencia probada desde hace muchos años en el manejo de infecciones experimentales con el virus de la peste porcina africana silvestre, patogénico. El personal al cargo de las instalaciones y el cuidado de los animales tiene experiencia equivalente. El personal tiene a disposición formaciones internas semestrales de bioseguridad, biocontención, uso de equipos críticos y equipos de protección individual. La mayoría de ellos son doctores en veterinaria o biología y el personal al cuidado de los animales dispone de la preceptiva autorización.

- 3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:
Aplicación de una desinfección de bancadas, superficies de trabajo e interior de cabinas de seguridad biológica, con diluciones 1/10 de lejía doméstica fresco, preparado en el día, con una concentración de cloro libre de 4.000-5.000 ppm, por tiempo de contacto 5-10



minutos y posterior retirada por aplicación de nebulización de una solución de etanol al 70%. Otros desinfectantes sustitutivos de la lejía diluida 1/10 son el Virkon al 1% o el PERAsafe a las concentraciones indicadas por el fabricante. En cuanto a animalario consultar procedimientos internos específicos, aunque el desinfectante de rutina es Virkon a concentraciones entre el 1% y el 4%.

- 4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:
Para CReSA-NBS3: Programa de mantenimiento de aparatos por el confinamiento, entendiendo como elementos de confinamiento; cabinas de seguridad biológica; centrifugas; autoclaves barrera y SAS (Airlock) MATACHANA, sistemas de generación de presión negativa, etc. Durante la parada técnica anual, los equipos son sometidos a verificación, y mantenimientos programados por parte de servicios técnicos externos (SAT), en ocasiones el mismo fabricante, con la emisión de los correspondientes informes de cumplimiento de especificaciones / rango de trabajo.

- 5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Para NBS3: Parada técnica anual de la Unidad de Alta Biocontención en la que se hace un control y revisión de los principales elementos críticos de la instalación. Control del confinamiento 24/365 por un sistema electrónico de gestión de parámetros críticos y un servicio del mantenimiento subcontratado externo siempre presente en la instalación. Auditorías internas a cargo del personal de la Oficina de Garantía de Calidad de CReSA.

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:

CONSENUM

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

Para CReSA-NBS3:

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



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

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

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

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

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

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

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

- 1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Inoculación accidental por mala praxis o uso de EPIs inadecuados; corte o pinchazo con objeto cortado o punzante por mala praxis o no uso de los EPIs correspondientes; inhalación y / o contacto con mucosas de producto químico tóxico, corrosivo, etc. por mala praxis o no uso de los EPIs correspondientes.



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

- 3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:
Procedimientos normalizados de trabajo de aparatos (CSB, centrifugas, autoclaves, etc.) y salas; normas de actuación en caso de derrames en cabinas de seguridad biológica, superficies y accidentes en centrifugas.

- 4) Planes de emergencia:
Hay un plan de emergencia aprobado a disposición del personal.



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

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

- 1) Entidad **IRTA-Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries**
Nombre:
Dirección postal: **Torre Marimon, Crt C-59 km 12,1; 08140, Caldes de Montbui**

- 2) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: **Josep Usall Rodié**
NIF: **40.893.753-Y**
Cargo: **Director General**
Tel: **934.674.040**
Fax: **934.674.042**
Correo electrónico: josep.usall@irta.cat

- 1) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos: **Fernando Rodriguez González**
NIF: **13.763.889-E**
Cargo: **Investigador**
Tel: **(+34) 93.467.40.40 Ext. 1771**
Fax: **(+34) 93.581.44.90**
Correo electrónico: fernando.rodriuez@irta.cat

- 2) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
Nombre y apellidos: **Xavier Abad Morejón de Girón**
NIF: **35.082.196-C**
Cargo: **Jefe de la Unidad de Biocontención y Laboratorios NBS2**
Tel: **(+34) 93.467.40.40 Ext. 1712**
Fax: **(+34) 93.581.44.90**
Correo electrónico: xavier.abad@irta.cat

- 3) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: **Xavier Abad.**

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 objetivos de la actividad son 1) evaluar la eficacia de un prototipo vacunal frente a PPA administrado por vía intranasal a dosis baja, esperando que la vacuna proteja eficazmente frente a una infección con una cepa virulenta de PPA, y 2) evaluar la diseminación de vacuna entre los animales.

Los dos objetivos se evaluarán en paralelo ya que se trata de la misma vacuna, y también interesa utilizar animales del mismo lote y origen para que los resultados en cuanto a respuesta inmunológica sean comparables.

Para ello, se utilizarán 36 animales divididos en 5 grupos:

Los grupos 1 y 2 se dedicarán al estudio de la eficacia, el grupo 1 se vacunará con el OMG, el grupo 2 quedará como grupo control no vacunado. Pasadas 3 semanas de la vacunación, se utilizarán animales troyanos (grupo 3) infectados con una cepa wild type de PPA (Georgia07) para desafiar por contacto a los los grupos 1 y 2. Cuatro semanas más tarde, se eutanasiaran todos los animales para obtener muestras de tejidos. Regularmente se obtendrán muestras (sangre e hisopos) de ambos grupos para evaluar la respuesta inmunitaria y la carga vírica.

Los otros dos grupos (4 y 5) se dedicarán al estudio de transmisión de vacuna. El grupo 4 se vacunará con el OMG y el grupo 5 no se vacunará. Ambos grupos convivirán en el mismo box durante 7 semanas. Regularmente se obtendrán muestras de los animales (sangre, hisopos) y ambientales para estudiar la respuesta inmunitaria (animales) y la carga vírica (animales y ambiente). Pasadas las 7 semanas se eutanasiaran todos los animales para obtener muestras de tejidos y estudiar la diseminación de la vacuna.

2) Duración prevista de la actividad:

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

El proyecto empezará en marzo 2023 y se prevé que finalice en junio 2023. La duración de la parte in vivo es de 9 semanas (2 semanas aclimatación y 7 semanas de estudio). La fase laboratorial se puede alargar unas semanas más después de finalizar la parte animal.



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:

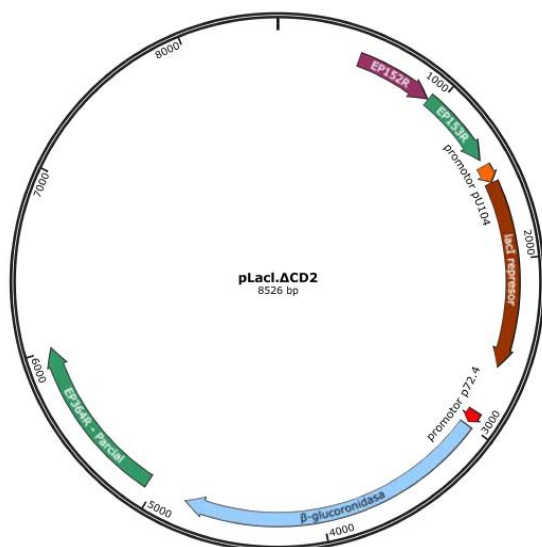
(Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto).

- a) Organismo receptor.
- b) Organismo donante.
- c) Inserto.
- d) Vector.
- e) Organismo modificado genéticamente resultante.
- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.
- g) Efectos para el medio ambiente.

La cepa BA71 Δ CD2 del virus de la peste porcina africana (VPPA) es un prototipo vacunal experimental. El VPPA afecta a cerdos domésticos y jabalíes, causando una patogenicidad caracterizada por una hemorragia interna generalizada que puede provocar mortalidades del 100% en cepas virulentas. Así, a partir de la cepa parental patógena BA71 se ha eliminado, mediante recombinación homóloga, la proteína CD2v codificada por el gen EP402R. Dicha delección hace que el virus sea atenuado en su huésped natural, el cerdo.

El organismo donante en el caso del OMG BA71 Δ CD2 es *Escherichia coli* (donante de β -glucuronidasa que reemplaza a CD2v). La obtención del plásmido de transferencia codificando para el gen gusA (utilizado como gen “reporter” en el OMG resultante) se hizo por síntesis *in vitro*.

El vector de transferencia utilizado fue el plásmido pLacI Δ CD2. El mapa del vector se muestra a continuación. Dicho vector no contiene ningún elemento regulatorio para eucariotas conocido.



El OMG resultante no muestra ningún cambio durante la replicación en cultivo celular (macrófagos alveolares porcinos y células COS-7), y es atenuado.

No se esperan interacciones con otros organismos en el medio ambiente ni tampoco ningún efecto en ningún otro organismo. Los experimentos se realizarán en instalaciones de bioseguridad de nivel 3 (BSL3), con lo que no se liberará al medio ambiente en ningún momento.

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 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 2 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 3 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Tipo 4 | <input type="checkbox"/> |

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.

- Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental).
- Concentración y escala utilizadas.



- 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).

Las características de la actividad son un uso confinado del OMG para inoculación en animales de experimentación (cerdos), y obtención de muestras para evaluar la respuesta inmune frente al mismo, la protección frente a una inoculación experimental con una cepa virulenta de PPA (Georgia 07) y la transmisión entre animales. El confinamiento será el típico de una unidad de Alta Biocontención de grandes animales (con duchas obligatorias de salida, filtración absoluta el aire, descontaminación química de los efluentes y eliminación de las carcasas infectadas por digestión alcalina o incineración). Todas estas barreras de confinamiento y control garantizan su no diseminación al exterior, por tanto, nulo impacto ambiental. Todos los residuos generados serán objeto de recogida por gestores autorizados. En los que respecta a la exposición humana, el patógeno animal es exclusivo de la especie porcina y no supone ningún riesgo para la especie humana, pero el personal en los boxes experimentales trabajará con guantes y mascarilla quirúrgica y en laboratorio todas las muestras se procesaran con los EPIs habituales y dentro de cabina de seguridad biológica.

A la escala utilizada no producirá sufrimiento para los animales inoculados, mientras que el virus salvaje es letal a la misma dosis.

El virus se crece en línea celular porcina *in vitro*. En cualquier caso, no se prevé tener que amplificar los stocks en el laboratorio.

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

A pesar de que se esté planteando su uso en campo en zonas de riesgo de infección con PPA; el OMG objeto de estudio ha sido categorizado como grupo de peligrosidad 3 por el responsable de bioseguridad de IRTA-CReSA hasta la finalización de todas las pruebas y la obtención de los resultados definitivos. Por tanto, las medidas a emplear serán las mismas que se utilizan para trabajar con el virus parental virulento, un agente de grupo de peligrosidad 3 y de declaración obligatoria a la OMSA (antigua OIE). Con este virus silvestre, sin modificar, el grupo solicitante lleva más de 20 años trabajando (los 10 últimos en IRTA-CReSA), incluso prestando apoyo a las administraciones públicas para su prevención y control, y siempre aprovechando las condiciones de alta seguridad biológica del CReSA.

- 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.)



- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.
- c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.
- d) Planes de emergencia.

No hay fuentes de peligro potenciales que puedan afectar a la actividad, aunque sea indirectamente; ni centrales eléctricas ni nucleares, embalses, ni instalaciones militares, ni objetivos estratégicos. No hay ríos cercanos que puedan salir de su cauce, ni bosques cercanos que puedan quemarse afectando al edificio.

El accidente puede producirse por el escape de algún material asociado al estudio. Los boxes experimentales disponen de ducha individual y ésta es obligatoria por lo que no hay que contar con arrastre del patógeno por el experimentador hacia el exterior. Además, hay una segunda ducha obligatoria antes de salir de la propia Unidad de Alta Biocontención. Toda la ropa e indumentaria se lava y se autoclava dentro de la instalación. Todos los residuos sólidos de laboratorio, asimilables a plástico de un solo uso, son sometidos a esterilización por autoclave (autoclaves bajo mantenimiento semestral y validados anualmente en ciclos con y sin carga, con datos con trazabilidad ENAC); todas las cargas individuales (ciclos) se trazan con testimonios biológicos que se incuban y se leen antes de decidir si la carga es eliminable.

Todas las carcasas de los animales, una vez acabado el experimento, son sometidas a digestión alcalina, a 150°C y pH de 13 por un periodo mínimo de 4 horas. Es imposible culminar el ciclo sin alcanzar estos parámetros y en todo caso el contenido procesado pasa a un tanque dentro de la Unidad de Alta Biocontención y, por tanto, queda retenido, antes de su bombeo a exterior donde es recogido por camión de empresa homologada para dicha recogida. Si el tanque se rompiera sería imposible que se liberara su contenido la exterior porque se encuentra dentro de una cubeta deprimida en la planta baja de la Unidad con una capacidad que excede con mucho el volumen nominal del tanque.

No es un virus de transmisión aerógena pero la Unidad dispone de un doble sistema de filtración HEPA del aire de salida de los boxes experimentales y laboratorios bajo Biocontención y uno de ellos va provisto de pre-filtro; si bien un accidente en un filtro HEPA es muy poco probable, la posibilidad que afecta a los dos al mismo tiempo es prácticamente cero.

Finalmente, los efluentes no pueden bombearse al exterior sin comprobación previa que los parámetros de la descontaminación química se han alcanzado (pH 12 por 12 horas en agitación); no pueden fluir fuera de la instalación tampoco al encontrarse los tanques todos ellos en el interior de una cubeta deprimida en la planta baja de la Unidad con una capacidad que excede con mucho el volumen nominal de los tanques y permitiría su descontaminación dentro de la Unidad en caso de rotura de los mismos.

Por otro lado, en caso de accidente del digestor podría la eliminación de carcasas realizarse en el incinerador que se encuentra también en la misma planta 0 de la Unidad de Alta Biocontención, que es utilizado también para la eliminación de piensos y alimentos sobrantes implicados en el estudio.



Hay un plan de emergencia y evacuación de la Unidad de Alta Biocontención, que es repasado semestralmente con el personal. En este plan se prioriza, siempre que es posible la bioseguridad, intentando que la salida del personal sea sin la indumentaria empleada dentro de la Unidad de Alta Biocontención, y aislado este personal del resto de personal evacuado de zonas convencionales.

Hay un plan de contingencias, lo que viene a llamarse un “disaster plan” que se adjunta como documentación complementaria de esta solicitud.