



**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](mailto: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.rodiguez@irta.cat](mailto:fernando.rodiguez@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](mailto: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 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: **27 mayo 2016**.
- b) Número de referencia del expediente: **A/ES/16/ I-06**

## **II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:**

- 1) Finalidad de la actividad:

**La peste porcina africana (PPA) representa hoy en día la mayor amenaza para la industria porcina en todo el mundo. No hay vacuna ni tratamiento contra el virus de la PPA (VPPA), y actualmente la única forma de luchar contra la enfermedad es el sacrificio de los animales afectados y de los que se encuentran dentro del perímetro del foco de la infección, medidas cuestionables desde el punto de vista tanto ético como económico. Así pues, la necesidad de obtener una vacuna frente a la PPA es máxima. Además, el desarrollo de vacunas de subunidades frente a la PPA será esencial para su uso en zonas libres de la enfermedad, donde la implementación de vacunas vivas atenuadas puede ser complicada por asuntos de bioseguridad. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han permitido identificar varias proteínas del VPPA que son ampliamente reconocidas por animales supervivientes a la PPA (inmunizados con un prototipo vacunal disponible en el laboratorio que consiste en un virus atenuado), y por tanto son buenos candidatos para su incorporación en vacunas de subunidades contra el VPPA. No obstante, no solo la identificación de antígenos es importante, sino que la forma de presentarlos es también clave para el éxito de la formulación vacunal.**

**Con el fin de utilizar el vector más adecuado, nuestro colaborador industrial nos ha proporcionado con su tecnología basada en el uso de un virus recombinante como vector viral. El vector viral utilizado ha sido ampliamente utilizado como vector viral vivo para la expresión de genes foráneos, ya que codifica por varios genes no esenciales que pueden**

---

<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.



ser reemplazados por genes foráneos sin afectar su proliferación en el huésped. Se utilizarán 7 vectores virales recombinantes codificando cada uno para una proteína del VPPA, más un vector viral codificando para la proteína verde fluorescente (GFP) como control. Su utilización en nuestras instalaciones de alta seguridad biológica del IRTA-CReSA permitiría establecer su seguridad y eficacia para ser utilizados en formulaciones vacunales frente al VPPA.

Se planea realizar un experimento en el que se inocularán cerdos domésticos con combinaciones de los vectores virales recombinantes codificando para proteínas del VPPA. Un cuarto grupo de animales se inoculará con el vector viral codificando para la GFP para servir como control negativo del experimento. Cada dosis consistirá en  $10^4$  dosis infectantes cincuenta (TCID<sub>50</sub>) para cada vector viral inoculado. Para mejorar la respuesta inducida, se inocularán 2 dosis de los vectores virales recombinantes en un intervalo de 3 semanas. Tres semanas tras la segunda dosis, los animales recibirán un desafío letal con una cepa de alta virulencia del VPPA para evaluar la capacidad protectora de los vectores virales recombinantes codificando para proteínas del VPPA. Durante el experimento se obtendrán muestras de suero, sangre, hisopos nasales y rectales para poder medir la respuesta inmune generada por las proteínas de las VPPA codificadas por los vectores virales recombinantes y evaluar la protección conferida siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio.

Todos los experimentos se realizarán en las instalaciones de alta biocontención (nivel de bioseguridad 3) del CReSA una vez aprobados por los comités de experimentación animal (IRTA y Generalitat) y el Comité de Bioseguridad del IRTA.

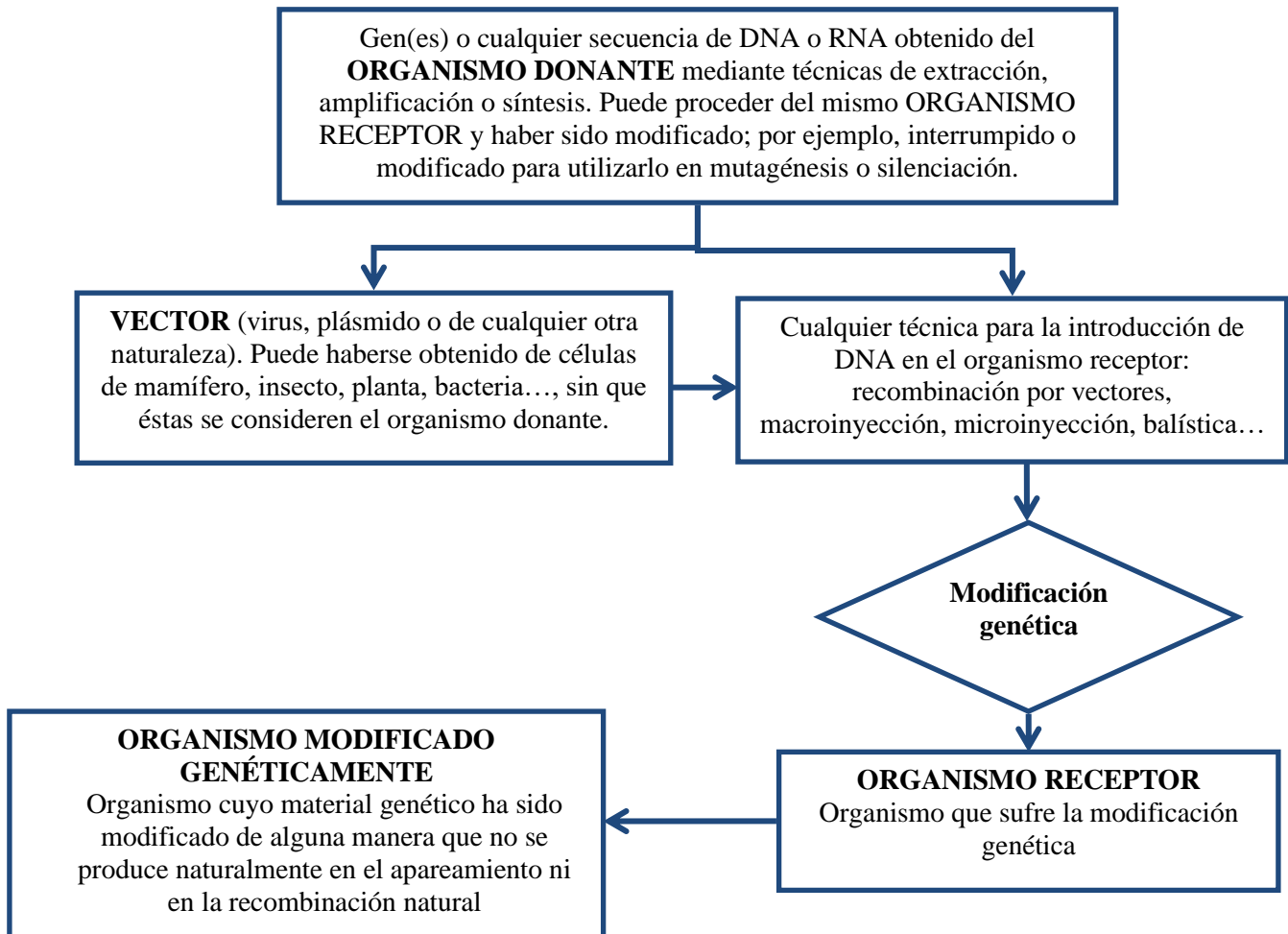
2) Clasificación de la actividad:

*(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: **Vector viral confidencial**

Taxonomía: **Familia Herpesviridae**

Nombre común: **Confidencial**

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento: **El esqueleto del vector viral utilizado está basado en una vacuna viral licenciada para cerdos. El virus se cultiva en una línea celular porcina, que es utilizada como máster cell seed por el socio industrial y se aísla por dilución límite.**

b) Técnicas de identificación: **Inmuno-marcaje con anticuerpos específicos, qPCR específica y secuenciación completa.**

c) Marcadores genéticos: **La secuencia completa del vector viral está publicada, así como las deleciones que llevan a su atenuación.**

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

e) Estabilidad genética: **Estable a largo plazo, confirmado por secuenciación completa utilizando NGS.**

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores: **Determinadas regiones genómicas del vector viral fueron deleccionadas debido a pases seriados en cultivo celular. Durante los pases en cultivo celular una gran parte no esencial del genoma se deleccionó, resultando en regiones no funcionales en el genoma. Las deleciones llevaron a la atenuación total del virus en su huésped natural (el cerdo doméstico), así como la no posible transmisión de un animal a otro.**

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI

NO

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

**La vacuna licenciada en la que se basa el vector viral utilizado muestra un fenotipo apatogénico en cerdos y su perfil de bioseguridad se ha verificado por su uso en el campo durante una década. Su potencial alergénico no se ha descrito. No se han clonado secuencias codificando para toxinas en el vector viral.**



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?

**El vector viral utilizado para manipulaciones genéticas se obtuvo de un vial de vacuna y fue cultivada en una línea celular porcina, que es utilizada como máster cell seed en los laboratorios del socio industrial y ha sido testada por la ausencia de agentes foráneos siguiendo las instrucciones del Center for Veterinary Biologics (CVB) de los Estados Unidos.**

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

**El esqueleto del vector viral utilizado está basado en una vacuna viral licenciada antes del año 2000. Toda experiencia adquirida por parte del socio industrial ha sido transferida al equipo de colaboración en el IRTA-CReSA, donde se trabaja con agentes biológicos de hasta nivel de bioseguridad BSL3+.**

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?:  
**Fuera de las condiciones de cultivo vector viral no puede expandirse, ya que necesita la presencia de células eucarióticas susceptibles. Se espera que el organismo receptor pueda sobrevivir fuera del huésped, pero al ser un virus con envuelta se puede desinfectar/inactivar con distintos métodos: 1-2 minutos de exposición con 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o solución de glutaraldehído al 0.1%. Sin tratamiento los virus con envuelta pueden mantenerse infecciosos hasta 3 días (Howie et al, 2008). No tiene la capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo.**

En caso afirmativo:

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     |                          |



- b) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:  
**Igual que otros virus con envuelta, una incubación a 90°C por 30 minutos inactiva el vector viral muy efectivamente.**
- c) Posibles nichos ecológicos:  
**El virus wild-type, del cual proviene el vector viral atenuado, es endémico en muchas partes del mundo, incluyendo en poblaciones de jabalíes.**
- d) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:  
**El vector viral utilizado no es contagioso después de la inyección intramuscular debido a las delecciones que contiene. Las delecciones en el genoma del vector viral no permiten la transmisión del virus de un animal a otro, y por lo tanto tampoco en el ambiente.**

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

- a) Implicaciones en procesos ambientales (*p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo*):  
**El vector viral utilizado no tiene influencia en la circulación ambiental de compuestos químicos.**
- b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:  
**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) 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 virus wild-type, del cual proviene el vector viral atenuado, se erradicó de la población de cerdo doméstico en algunas regiones del mundo, incluidas algunas partes de Europa. El virus es endémico globalmente en poblaciones de jabalíes, pero la transmisión a cerdos domésticos no se ha descrito por el momento.**

12) Hábitat natural del organismo:

**El virus wild-type del que proviene el vector viral causa una enfermedad respiratoria y reproductiva en su huésped natural, el cerdo adulto, pero la mortalidad es rara. Por el contrario, los lechones jóvenes son más susceptibles a la enfermedad. Otras especies que no son huéspedes naturales (vacas, ovejas, gatos, perros, conejillos de indias, ratas y ratones) pueden ser afectadas debido a infección accidental.**

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

- 1) Nombre científico: **Virus de la peste porcina africana (VPPA)**



Taxonomía: **Único miembro de la familia Asfarviridae, genus Asfvirus**

Nombre común: **Virus de la peste porcina africana (VPPA)**

1) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: **Seis genes del VPPA y la proteína fluorescente verde (GFP) fueron utilizados para generar los vectores virales recombinantes.**

2) Método de obtención:

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

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

**Los genes del VPPA han sido seleccionados en base a estudios previos que los han identificado como inductores de respuestas inmunes y por lo tanto como potenciales candidatos para su incorporación en formulaciones vacunales de subunidades frente el VPPA. La función de las proteínas seleccionadas se especifica a continuación:**

- **XXX: Codifica para una proteína XXX.**
- **XXX: Codifica para la proteína XXX.**
- **XXX: Codifica para una XXX.**
- **XXX: Tiene alta similitud con XXX.**

**Se desconoce la función de las proteínas codificadas por XXX, XXX y XXX.**

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

SI  NO

En caso afirmativo, especificar para que organismos:

- i) seres humanos
- ii) animales
- iii) plantas

a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

**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 altamente virulentas. Un cerdo o un jabalí infectado muere en apenas 1-2 semanas.**

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





**No. El VPPA es un virus altamente complejo que codifica por más de 150 proteínas, una sola proteína no puede causar la enfermedad.**

- 5) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?  
**No.**

## **V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA**

- 1) Tipo de modificación genética:

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

- 2) Finalidad de la modificación genética:

**La finalidad es la de conseguir vectores virales recombinantes codificando por proteínas de una cepa del genotipo II del VPPA para su uso en formulaciones vacunales.**

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

**Recombinación homóloga entre un plásmido donante codificando para un gen del VPPA y el vector viral receptor. Los insertos fueron incorporados en regiones no esenciales del genoma del vector viral. La inserción se seleccionó de manera que ningún elemento funcional del vector viral upstream o downstream de la secuencia (secuencia polyA, promotores) no se vieran afectados. Con esta metodología no se generaron cambios en la secuencia del genoma del vector viral recombinante con excepción de la inserción del casete de expresión consistente en: Promotor-Gen de interés-secuencia polyA-Pause site.**

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

SÍ  NO

En caso afirmativo:

- a) Tipo e identidad del vector:

**El vector de transferencia utilizado fue el plásmido pUC57. Este vector no contiene ningún elemento regulatorio para eucariotas conocido. En el sitio de clonación múltiple del vector se clonó: Región 5' flanqueante-promotor-Gen de interés-secuencia polyA-sitio de pausa transcripcional-Región 3' flanqueante.**

- 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*):  
**Documento adjunto (confidencial).**

d) Gama de hospedadores del vector:  
**Sólo para transformación en *E.coli* y recombinación con el vector viral. Este vector para expresión bacteriana no contiene ningún elemento regulatorio para eucariotas conocido.**

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?  
**El gen de resistencia a Ampicilina está presente sólo en el plásmido pUC57 pero no en el OMG final.**

5) Información del inserto:

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

**Las secuencias nucleotídicas de los insertos del VPPA fueron sintetizadas en base a secuencias públicas en la base de datos del NCBI. Se adjunta documento con las secuencias. Los mapas de restricción se especifican en el archivo adjunto, figuras 3 y 4 (confidencial).**

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

**El promotor y la secuencia Poly A utilizadas han estado descritas previamente y son ampliamente utilizadas para la expresión de proteínas en sistemas eucariotas.**

**La función de las proteínas del VPPA seleccionadas se especifica a continuación:**

- **XXX: Codifica para una proteína XXX.**
- **XXX: Codifica para la proteína XXX.**
- **XXX: Codifica para una XXX.**
- **XXX: Tiene alta similitud con XXX.**

**Se desconoce la función de las proteínas codificadas por XXX, XXX y XXX.**

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

**Transfección con el vector bacteriano de transferencia y el genoma del vector viral purificado.**

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



**Las secuencias de los insertos del VPPA se basaron en: codón de inicio-secuencia de la proteína-codón de stop. La función de las proteínas del VPPA seleccionadas se especifica a continuación:**

- **XXX: Codifica para una proteína XXX.**
- **XXX: Codifica para la proteína XXX.**
- **XXX: Codifica para una XXX.**
- **XXX: Tiene alta similitud con XXX.**

**Se desconoce la función de las proteínas codificadas por XXX, XXX y XXX.**

- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:  
**El promotor eucariota y la secuencia de poly A utilizados para la expresión de las proteínas del VPPA en el contexto del vector viral son ampliamente utilizados desde hace más de 20 años.**
- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?  
**Las secuencias de los genes inserto así como los elementos regulatorios localizados entre las secuencias flanqueantes del vector viral apropiadas fueron verificadas por secuenciación del genoma del vector viral completo utilizando Next Generation Sequencing con la tecnología MiSeq.**
- 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.  
**Se desconoce la función de 4 de las proteínas del VPPA codificadas por los vectores virales recombinantes.**

## **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.

**La secuencia nucleotídica los genes insertados se ha determinado por secuenciación completa del genoma de los vectores virales recombinantes por NGS. Además, la correcta expresión de las proteínas codificadas por los genes introducidos se ha determinado mediante ensayos de inmunodetección (western-blot, inmunofluorescencia) utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas de interés.**

- 2) Características genéticas y fenotípicas modificadas del organismo receptor como resultado de la manipulación genética:
- a) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese:  
**No.**
  - b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese:  
**No.**
  - c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar:  
**No.**
  - d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:



No.

- e) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese: **No aplica.**
- f) Marcadores específicos del OMG:  
**Cada vector viral recombinante codifica por una proteína del VPPA, que puede ser distinguible por PCR o anticuerpos contra esa proteína específica. Un vector viral codifica para la GFP.**
- 3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):  
**Estable a largo plazo, confirmado por secuenciación completa utilizando NGS.**
- 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:  
**Secuenciación completa. Immunomarcaje con anticuerpos específicos para las proteínas codificadas en cada vector viral.**
- b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:  
**Los vectores virales recombinantes se usarán únicamente en las instalaciones de alta seguridad biológica del IRTA-CReSA por lo que no habrá liberación en el medio ambiente.**

## 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:  
**Se plantea realizar un experimento en el que se inocularán cerdos domésticos con los vectores virales recombinantes codificando por proteínas del VPPA. Un cuarto grupo de animales se inoculará con el vector viral codificando para la GFP para servir como control negativo del experimento. Cada dosis consistirá en  $10^4$  dosis infectantes cincuenta (TCID<sub>50</sub>) en 1ml para cada vector viral recombinante inoculado. Para mejorar la respuesta inmunitaria inducida, se inocularán 2 dosis de los vectores virales recombinantes en un intervalo de 3 semanas.**



**Por lo tanto, el volumen máximo de cada vector viral recombinante será de 2ml y una concentración de  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml.**

- b) Número de plantas:
- c) Número de animales:

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 asociadas las actividades con los OMG).*

**IRTA y un colaborador industrial tienen firmado un acuerdo de investigación con el objetivo de avanzar en el desarrollo de una vacuna eficaz contra la PPA (diciembre 2019-diciembre 2022). Se plantea realizar el experimento in vivo con vectores virales recombinantes en el período octubre-diciembre 2022. Todos los experimentos se realizarán en las instalaciones de alta seguridad del CReSA una vez aprobados por los comités de experimentación animal (IRTA y Generalitat) y el comité de Bioseguridad del IRTA.**

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

**En el contexto del acuerdo de investigación entre IRTA y el colaborador industrial para avanzar en el desarrollo de una vacuna eficaz contra la PPA, se contempla importar los vectores virales recombinantes codificando para proteínas del VPPA generados dentro del marco de la colaboración y realizar un experimento en el que se inocularán cerdos domésticos con los vectores virales recombinantes codificando por proteínas del VPPA. Un cuarto grupo de animales se inoculará con el vector viral codificando para la GFP para servir como control negativo del experimento. Cada dosis consistirá en  $10^4$  dosis infectantes cincuenta (TCID<sub>50</sub>) para cada vector viral inoculado. Para mejorar la respuesta inmunitaria inducida, se inocularán 2 dosis de los vectores virales recombinantes en un intervalo de 3 semanas. Tres semanas tras la segunda dosis, los animales recibirán un desafío letal con una cepa del VPPA del genotipo II (virulenta y altamente patogénica) para evaluar la capacidad protectora de los vectores virales recombinantes codificando por proteínas del VPPA. Durante el experimento se obtendrán muestras de suero, sangre, hisopos nasales y rectales para poder medir la respuesta inmune generada por los vectores virales recombinantes y evaluar la protección conferida siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio. Así pues, la utilización de los vectores virales recombinantes en las instalaciones de alta seguridad biológica del IRTA-CReSA, permitirá evaluar la capacidad protectora de los vectores virales recombinantes codificando por proteínas del VPPA así como identificar la respuesta inducida por cada uno de los antígenos. Nuestro laboratorio se ha especializado en desarrollar las técnicas inmunológicas adecuadas para poder asegurar el éxito de nuestro objetivo y a largo plazo, conseguir una formulación vacunal óptima frente a la PPA.**



- 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:

**Los vectores virales han sido producidos por el socio industrial. La empresa está registrada conforme a la normativa europea vigente sobre OMG.**

- 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*):

**En lo que respecta al movimiento del OMG en su importación se cumplirán todos los requerimientos de designación/caracterización del material, etiquetado y marcado y homologación del paquete, según normas IATA, y se contratará un servicio de solvencia contrastada. En caso de enviar muestras biológicas al promotor para su posterior análisis, lo haremos vía World Courier o DHL como transporte de material peligroso, en caso de que sean muestras a ser procesadas a NBS3. El paquete también cumplirá todos los requerimientos de embalaje, marcado y etiquetado prescritos a las normas de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA), de forma que no sea posible su ruptura y por tanto, contaminación del medio.**

- 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*):

**El OMG se manejará siempre dentro de las instalaciones del IRTA-CReSA. Tras la inoculación *in vivo* del OMG, se obtendrán muestras de 5 ml sangre sin anticoagulante a días 0 (antes de la inoculación), 7, 14 y 21 para comprobar que el OMG genera una respuesta inmune en el animal. Estas muestras siempre se usarán contemplando las reglas de seguridad establecidas en el laboratorio, dentro de barreras primarias, CSB (ver apartado 8 del título VII).**

**Del mismo modo, los efluentes (orina, heces de los animales) se inactivan de manera rutinaria (desinfección química previa separación de sólidos destinados a incineración) y en ningún caso se espera recuperar muestras con altas concentraciones de virus, siempre muy por debajo del stock original.**

---

<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) nº 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) nº 1255/97.
- **Reglamento (CE) nº 1946/2003** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente [Diario Oficial L 287 de 5.11.2003].
- **Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad.** Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: <https://bch.cbd.int/protocol/>



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

**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**





**Biocontención del CReSA (instalación autorizada por el trabajo con OMG de tipo 3 (A / SE / 16 / I-06)) y laboratorios de nivel de seguridad 2 del CReSA, para las muestras inactivadas que se extraigan de la Unidad.**

## **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/enero/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, patógeno. 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 fresca, 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.**



**Para CReSA-NBS2: Programa de mantenimiento de aparatos por el confinamiento, entendiendo como elementos de confinamiento; cabinas de seguridad biológica y autoclaves. Durante la parada técnica anual, los equipos son sometidos a verificación, y mantenimientos programados por parte de 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 Unidad de Garantía de Calidad de CReSA.**

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

- 1) Encargado de la gestión de residuos:

a) gestión interna: SÍ  NO

b) gestión por una empresa externa: SÍ  NO

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

- 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.**  
  
**Para CReSA-NBS2: El trabajo se hace provisto con una bata de laboratorio sobre la ropa personal o sobre pijamas a disposición del personal técnico e investigador. Bata con cierre por delante y puño cerrado. Guantes de nitrilo o látex para cualquier**



**manipulación en CSB y siempre que se manipulen muestras o sus derivados. Posibilidad de emplear manguitos, pantallas faciales, gafas de seguridad y mascarillas FFP3 o equivalentes en función del patógeno.**

- 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](mailto:josep.usall@irta.cat)
  
- 3) 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.rodiguez@irta.cat](mailto:fernando.rodiguez@irta.cat)
  
- 4) 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](mailto:xavier.abad@irta.cat)
  
- 5) 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: IRTA en colaboración con un socio industrial tienen firmado un acuerdo de investigación con el objetivo de avanzar en el desarrollo de una vacuna eficaz contra la PPA (diciembre 2019-diciembre 2022). Dentro de este contexto, se contempla importar vectores virales recombinantes codificando para proteínas del VPPA (identificadas como inmunogénicas en el marco de la colaboración) y realizar un experimento en el que se inocularán cerdos domésticos con los vectores virales codificando por las proteínas del VPPA identificadas, y posteriormente serán desafiados con una cepa virulenta del VPPA para evaluar la capacidad protectora de los vectores virales recombinantes. Así pues, la utilización de los vectores virales recombinantes en nuestras instalaciones de alta seguridad biológica del IRTA-CReSA, permitirá evaluar la capacidad protectora de los vectores virales recombinantes codificando por proteínas del VPPA, así como identificar la respuesta inducida por cada uno de los antígenos del VPPA codificados por los vectores virales. El grupo de VPPA del IRTA-CReSA está especializado en desarrollar técnicas inmunológicas adecuadas para poder asegurar el éxito de nuestro objetivo y a largo plazo, conseguir una formulación vacunal óptima frente a la PPA.**
- 2) **Duración prevista de la actividad: Se inocularán cerdos domésticos (*Sus scrofa*) con los vectores virales codificando por proteínas del VPPA. Un grupo de animales se inoculará con el vector viral codificando para la proteína fluorescente verde (GFP) para servir como control negativo del experimento. Cada dosis consistirá en  $10^4$  dosis infectantes cincuenta (TCID<sub>50</sub>) para cada vector viral inoculado. Para mejorar la respuesta inmunitaria inducida, se inocularán 2 dosis de los vectores virales en un intervalo de 3 semanas. Tres semanas tras la segunda dosis, los animales recibirán un desafío letal con una cepa del VPPA de alta virulencia para evaluar la capacidad protectora de los vectores virales recombinantes codificando por proteínas del VPPA. Durante el experimento se obtendrán muestras de suero, sangre, hisopos nasales y rectales para poder medir la respuesta inmune generada por los vectores virales recombinantes y evaluar la protección conferida siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio. Después del desafío, los animales se mantendrán un máximo de 28 días, y distintos órganos (tonsila, bazo, linfonodo submandibular y gastro hepático) se recogerán durante las necropsias para medir respuesta inmune y títulos virales. En total, el experimento durará unas 11 semanas.**

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

*(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.
- 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.

**El esqueleto del vector viral utilizado está basado en una vacuna viral licenciada. Determinadas regiones genómicas del vector viral fueron deletadas debido a pases seriados en cultivo celular. Durante los pases en cultivo celular una gran parte no esencial del genoma se deletó, resultando en regiones no funcionales. Además, las deletas llevaron a la atenuación total del virus en su huésped natural (el cerdo doméstico), y la transmisión de un animal a otro no es posible debido a las deletas del genoma del virus recombinante.**

**El organismo donante es una cepa virulenta y altamente patogénica de genotipo II del virus de la peste porcina africana (VPPA). En general, el VPPA afecta a cerdos domésticos y jabalíes, causando una patología caracterizada por una hemorragia interna generalizada que puede provocar mortalidades del 100% cuando se utilizan cepas altamente virulentas. Un cerdo o un jabalí infectado muere en apenas 1-2 semanas después de la inoculación. La obtención del plásmido de transferencia codificando para cada gen del VPPA se hizo por síntesis in vitro, por lo que no se manipuló en ningún momento el virus wild-type.**

**El vector de transferencia utilizado fue el plásmido pUC57. Este vector no contiene ningún elemento regulatorio para eucariotas conocido. En el sitio de clonación múltiple del vector se clonó: Región 5' flanqueante-promotor-Gen de interés-secuencia polyA-sitio de pausa**



transcripcional-Región 3' flanqueante. Las secuencias nucleotídicas de los insertos del VPPA fueron sintetizadas en base a secuencias públicas en la base de datos del NCBI.

Los organismos modificados genéticamente resultantes no muestran ningún cambio durante la replicación en cultivo celular en una línea celular porcina, y continúan siendo atenuados como el vector viral original, ampliamente utilizado como vector viral vivo para la expresión de genes foráneos.

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.
- 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 y su capacidad de conferir protección frente a un aislado virulento de VPPA. 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 el hombre pero el**





personal en los boxes experimentales trabajará con guantes y mascarilla quirúrgica y en laboratorio todas las muestra se procesaran con los EPIs habituales y dentro de cabina de seguridad biológica.

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

Los vectores virales recombinantes se crecen en línea celular porcina *in vitro*. En cualquier caso, no se prevé tener que amplificar los stocks en el laboratorio del IRTA-CReSA.

- 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. 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 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.