



**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.rodriuez@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: Convocatoria 2019 "Proyectos de I+D+i"

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: PID2019-107616RB-I00, Fernando Rodríguez (IP)

-Organismo financiador: Ministerio de Ciencia e Innovación

- 3) Instalación donde se va a desarrollar la actividad de utilización confinada (*cumplimente si previamente ha sido comunicada/autorizada para este tipo de actividades; en caso contrario, cumplimente el Formulario Parte B*).
- a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación: **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, de declaración obligatoria a la OMSA (antigua OIE), 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 visto tanto ético como económico. Así pues, la necesidad de obtener una vacuna frente a la PPA es máxima. En nuestro grupo hemos desarrollado un prototipo vacunal LAV (*live-attenuated vaccine*): una cepa del VPPA atenuada mediante delección del CD2v, codificado por el gen EP402R. Dicha cepa es capaz de proteger frente a una infección por su cepa parental y frente a otras cepas del mismo genotipo (genotipo I) o de otros (genotipo II). Para asegurar su atenuación y estabilidad, realizamos dobles delecciones y estamos procediendo a realizar pruebas para confirmar que no se producen reversiones a la virulencia. 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 Se inocularán intranasalmente cerdos domésticos (*Sus scrofa*) con 10^5 PFU del prototipo vacunal BA71ΔCD2ΔUK. A partir de la inoculación se registrará diariamente la sintomatología de los animales.

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.



Pasados 14 días de la inoculación, los animales serán sacrificados y se obtendrán muestras de diversos tejidos (sangre, hisopos nasales, bazo, tonsila, linfonodos gastrohepático y submandibulares, GALT y BALT) tanto para poder valorar la respuesta inmune generada y evaluar la protección conferida siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio como para determinar el mejor tejido para aislar el virus vacunal. Un pool de las muestras que presenten el mayor título viral se usará para preparar un nuevo inóculo y administrarlo a otro grupo de animales naïf en el que será el siguiente pase. Este proceso se repetirá un mínimo de dos y un máximo de seis veces. Si en algún pase no se recuperara virus del pase previo, se administrará a los animales con el mismo pool de muestras en que se detectó virus vacunal por última vez. En total, el experimento *in vivo* tiene una duración máxima prevista de unos 126 días. 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 y la Comisión Nacional de Bioseguridad.

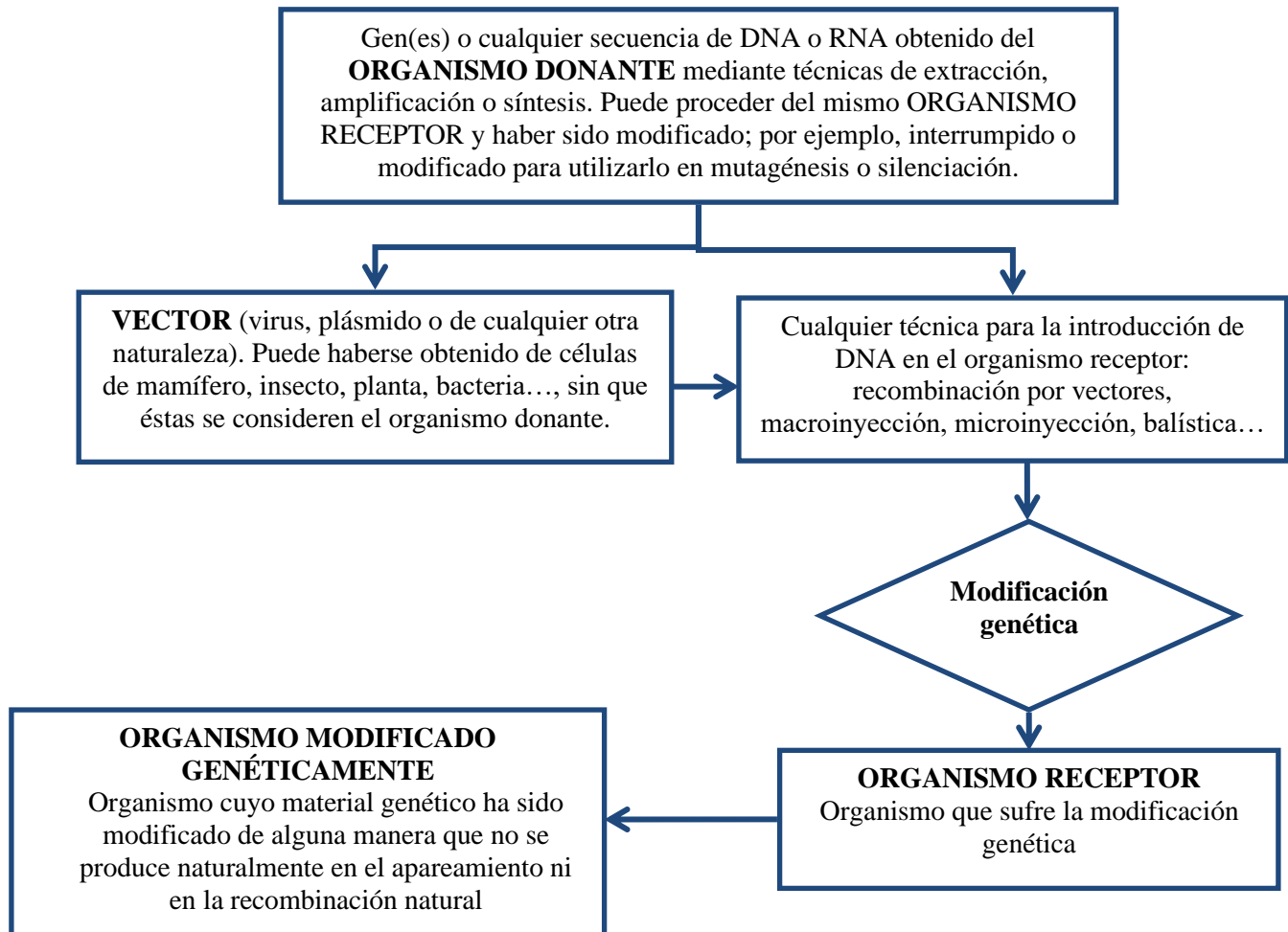
2) Clasificación de la actividad:

(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: **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.**

b) Técnicas de identificación: **PCR.**

c) Marcadores genéticos: **PCR de las proteínas p72 o p30.**

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

e) Estabilidad genética: **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?:
Fuera de las condiciones de cultivo el VPPA 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. El MAPA ha listado una serie de desinfectantes válidos para eliminar la viabilidad del VPPA (https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/listadeproductosdeeficiaprobadafrentealvirusdelappaunio_tcm30-510548.pdf) .

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:

EL VPPA es resistente en el medio ambiente. La estabilidad del VPPA en diferentes condiciones ambientales fue objeto de numerosos estudios, la mayoría de ellos se llevaron a cabo en el siglo pasado y deberían revisarse/actualizarse.

c) Posibles nichos ecológicos:

Cerdos, jabalíes, garrapatas del género *Ornithodoros* y cerdos salvajes africanos (facóqueros...)

d) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica.

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

No aplica.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:



No aplica: 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:
Erradicado de España. Actualmente circulando en diversos de Europa (incluyendo UE), gran parte de Asia, isla de Haití y diversos países del África Subsahariana.
- 12) Hábitat natural del organismo:
Cerdos, jabalíes, garrapatas blandas del género *Ornithodoros* y cerdos salvajes africanos,

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Organismo donante de mCherry

Nombre científico: *Discosoma molle*

Taxonomía: **Reino: *Animalia***

Filo: *Cnidaria*

Clase: *Anthozoa*

Orden: *Corallimorpharia*

Familia: *Discosomidae*

Género: *Discosoma*

Especie: *D. molle*

Nombre común: **Anémona disco**

Organismo donante de GFP

Nombre científico: *Aequorea victoria*

Taxonomía: **Reino: *Animalia***

Filo: *Cnidaria*

Clase: *Hydrozoa*



Orden: *Hydroida*

Familia: *Aequoreidae*

Género: *Aequorea*

Especie: *A. victoria*

Nombre común: **medusa de cristal**

1) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: **ADN mCherry (gen “reporter”) y ADN GFP (gen “reporter”)**

2) Método de obtención:

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

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

mCherry es un miembro de la familia mFruits de proteínas fluorescentes rojas monoméricas (mRFP, del inglés *monomeric red fluorescent proteins*).

GFP (del inglés *green fluorescent protein* o proteína verde fluorescente) es una proteína que emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible.

¿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?

No aplica.

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

No.



- 4) ¿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:

Atenuación de la patogenicidad, de cara a ser utilizado como vacuna: deleción de la proteína CD2v, codificada por el gen EP402R e inserción del gen “reporter” mCherry en su lugar y deleción de la uridina quinasa (UK) codificada por el gen DP96R e inserción del gen “reporter” GFP en lugar de UK.

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

Recombinación.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

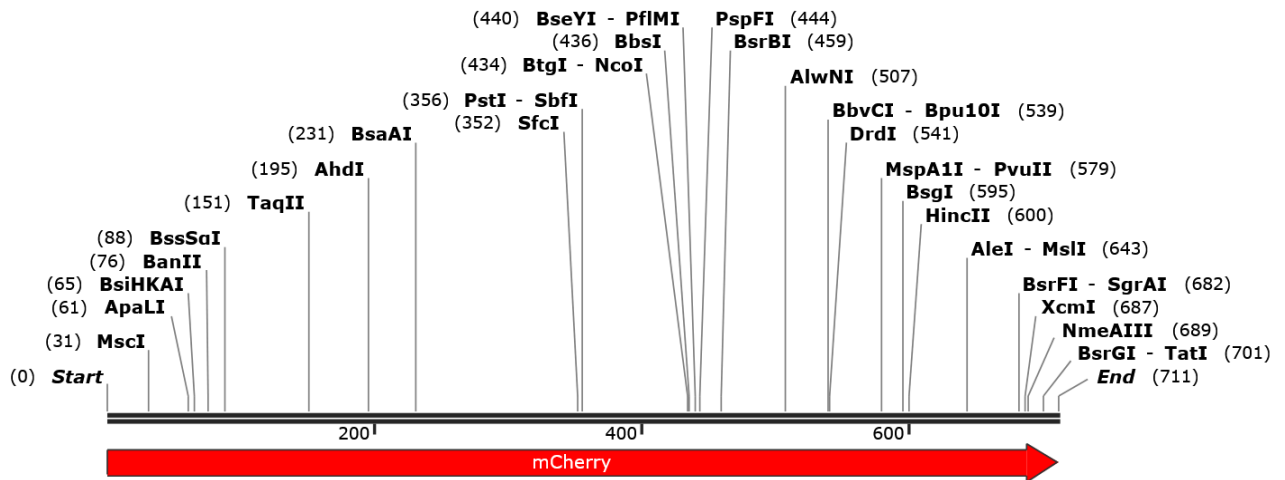
- a) Tipo e identidad del vector:

Plásmido mCherry
Plásmido GFP

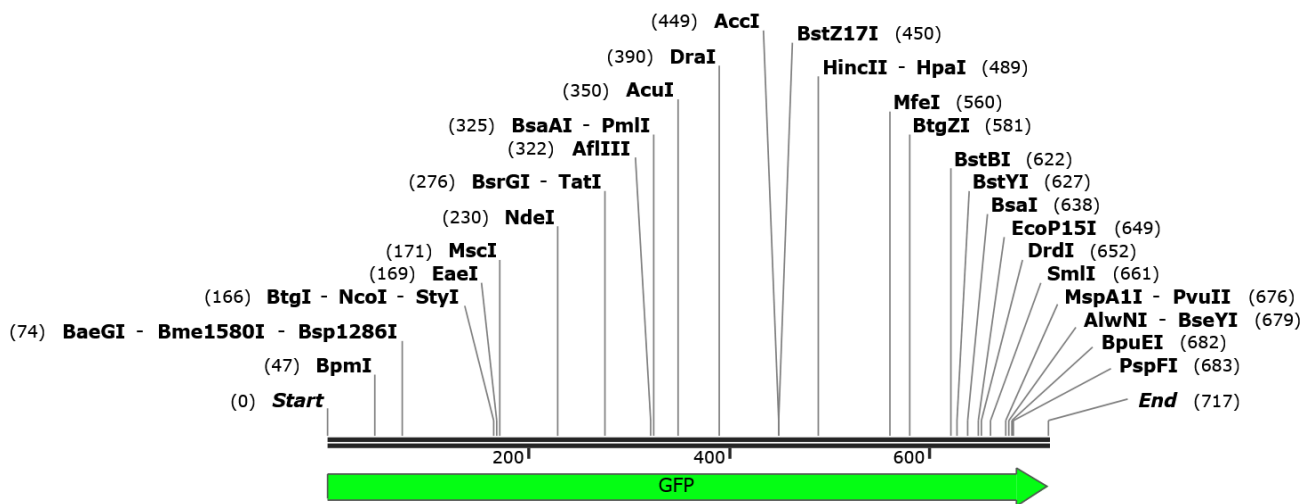
- b) Si se trata de un virus:

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*):



mCherry
711 bp



GFP
717 bp

- d) Gama de hospedadores del vector:
Sólo para transformación en *E.coli* y recombinación con VPPA.
- e) Características de la movilidad del vector:
- factores de movilización. **No aplica.**
 - Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?
No aplica.
 - ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?
No.



5) Información del inserto:

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

mCherry gene sequence:

```
1 atggtgagca agggcgagga ggataacatg gccatcatca aggagtcat gcgcttcaag
61 gtgcacatgg agggctccgt gaacggccac gagttcgaga tcgagggcga gggcgagggc
121 cgcccctacg agggcaccca gaccgccaag ctgaagggtga ccaaggggtgg ccccctgccc
181 ttgcctggtg acatcctgtc ccctcagttc atgtacggct ccaaggccta cgtgaagcac
241 cccgccgaca tccccgacta cttgaagctg tccttccccg agggcttcaa gtgggagcgc
301 gtgatgaact tcgaggacgg cggcgtggtg accgtgaccc aggactcctc cctgcaggac
361 ggcgagttca tctacaaggt gaagctgcgc ggcaccaact tcccctccga cggccccgta
421 atgcagaaga agacatggg ctgggaggcc tcctccgagc ggatgtaccc cgaggacggc
481 gccctgaagg gcgagatcaa gcagaggctg aagctgaagg acggcggcca ctacgacgct
541 gaggtcaaga ccacctaca ggccaagaag cccgtgcagc tgcccggcgc ctacaacgtc
601 aacatcaagt tggacatcac ctcccacaac gaggactaca ccatcgtgga acagtacgaa
661 cgcgccgagg gccgccactc caccggcggc atggacgagc tgtacaagta a
```

GFP gene sequence:

```
1 tacacacgaa taaaagataa caaagatgag taaaggagaa gaacttttca ctggagtgtg
61 cccaattctt gttgaattag atggcgatgt taatgggcaa aaattctctg tcagtggaga
121 gggatgaagg gatgcaacat acggaaaact tacccttaa tttatttgca ctactgggaa
181 gctacctgtt ccatggccaa cacttgtcac tactttctct tatggtgttc aatgcttttc
241 aagataccca gatcatatga aacagcatga ctttttcaag agtgccatgc ccgaaggtta
301 tgtacaggaa agaactatat ttacaaaaga tgacgggaac tacaagacac gtgctgaagt
361 caagtttgaa ggtgataccc ttgttaatag aatcgagtta aaaggtattg attttaaaga
421 agatggaaac attcttgac acaaaatgga atacaactat aactcacata atgtatacat
481 catggcagac aaaccaaaga atggaatcaa agttaacttc aaaattagac acaacattaa
541 agatggaagc gttcaattag cagaccatta tcaacaaaat actccaattg gcgatggccc
601 tgtcctttta ccagacaacc attacctgtc cacacaatct gccctttcca aagatcccaa
661 cgaaaagaga gatcacatga tccttcttga gtttgtaaca gctgctggga ttacacatgg
721 catggatgaa ctatacaaat aaatgtccag acttccaatt gacactaaag tgtccgaaca
781 attactaaat tctcaggggt cctgggttaa ttcaggctga gactttattt atatatttat
841 agattcatta aaattttatg aataatttat tgatgttatt aataggggct attttcttat
901 taaataggct actggagtgt at
```

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



La función de las proteínas es la de emitir fluorescencia, en el OMG actúan como genes “reporter”

- 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)

Aportar toda la documentación al respecto.

Publicada en <https://doi.org/10.3390/v13091678>.

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:
Genes “reporter” mCherry y GFP.

3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):

Es estable a largo plazo, análisis en curso.



- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos:
No.
- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
- Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:
PCR, secuenciación.
 - 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 en el medio ambiente.

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

- 1) Naturaleza de las operaciones:
- Enseñanza
 - Investigación
 - Desarrollo
- 2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:
- Volumen máximo en el caso de microorganismos:
Dosis segura $10^4 - 10^6$ PFU/animal.
 - Número de plantas: **no aplica**
 - Número de animales: **no aplica**

- 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).

En la línea de desarrollo de una vacuna contra la PPA, se plantea iniciar el experimento *in vivo* alrededor de octubre 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 y la Comisión Nacional de Bioseguridad.

- 4) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados:
En el contexto del desarrollo de una vacuna eficaz contra 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:

El OMG procede del centro de la USDA Plum Island Animal Disease Center, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Greenport, NY 11944, USA.

- 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*):

En lo que respecta al movimiento del OMG en su importación se cumplieron todos los requerimientos de designación/caracterización del material, etiquetado y marcado y homologación del paquete, según normas IATA.

- 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 con y sin anticoagulante antes y después de su inoculación, así como hisopos nasales y muestras de saliva, y, al final del experimento, muestreo de diversos tejidos durante la necropsia, con el fin de estudiar la respuesta inmune generada por el OMG en el animal y si esta se ve mejorada por el uso del adyuvante experimental. 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).

A partir de la inoculación se registrará diariamente la sintomatología de los animales. Pasados 14 días de la inoculación, los animales serán sacrificados y se obtendrán muestras de diversos tejidos (sangre, hisopos nasales, bazo, tonsila, linfonodos gastroheopático y submandibulares, GALT y BALT) tanto para poder valorar la respuesta inmune generada y evaluar la protección conferida siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio como para determinar el mejor tejido para aislar el virus vacunal. Un pool de las muestras que presenten el mayor título viral se usará para preparar un nuevo inóculo y administrarlo a otro grupo de animales naif en el que será el

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) 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/>



siguiente pase. Este proceso se repetirá un mínimo de dos y un máximo de seis veces. Si en algún pase no se recuperara virus del pase previo, se administrará a los animales con el mismo pool de muestras en que se detectó virus vacunal por última vez.

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. Las carcasas susceptibles de haber contenido el OMG serán sometidas a ciclo de digestión alcalina o incineración dentro de las instalaciones de IRTA-CReSA.

- 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/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%.



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

- 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.rodriguez@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

- 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: **una de las líneas prioritarias de investigación en el IRTA-CReSA es el desarrollo de una vacuna eficaz contra la PPA. Así, hemos desarrollado diversos prototipos vacunales LAV (*live-attenuated vaccine*) basados en la cepa de VPPA BA71 (genotipo I) atenuada mediante modificación genética (OMG). Dentro de este contexto, el objetivo del presente estudio es la evaluación de la ausencia de regresión a la virulencia de dos de dichos prototipos vacunales contra la PPA cuando se administran por vía intranasal en una sola administración. Así, se realizará entre un mínimo de dos y un máximo de seis pases seriados, para determinar la posibilidad de regresión a la virulencia de la LAV. Para tal fin, los animales serán inmunizados con el prototipo vacunal, se valorará su respuesta inmune y serán posteriormente sacrificados, se aislará el virus vacunal de sus tejidos, se titulará y con el virus aislado de dichos animales se volverá a inmunizar intranasalmente con la misma dosis a una nueva población de cerdos. Este proceso se repetirá un máximo de seis veces, esperando que no se produzca una reversión a la virulencia, que se verificaría por la aparición de los síntomas de la PPA. La utilización de los OMG en nuestras instalaciones de alta seguridad biológica del IRTA-CReSA, permitirá evaluar la seguridad de dichas LAV. Dichos ensayos están financiados por una ayuda de la Convocatoria 2019 "Proyectos de I+D+i" titulada "Peste porcina africana: De la emergencia a evitar el endemismo (ASFREP)", referencia PID2019-107616RB-I00.**
- 2) Duración prevista de la actividad: **Se inocularán intranasalmente cerdos domésticos (*Sus scrofa*) con 10^5 PFU del prototipo vacunal BA71 Δ CD2 Δ UK. A partir de la inoculación se registrará diariamente la sintomatología de los animales. Pasados 14 días de la inoculación, los animales serán sacrificados y se obtendrán muestras de diversos tejidos (sangre, hisopos nasales, bazo, tonsila, linfonodos gastrohepático y submandibulares, GALT y BALT) tanto para poder valorar la respuesta inmune generada y evaluar la protección conferida siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio como para determinar el mejor tejido para aislar el virus vacunal. Un pool de las muestras que presenten el mayor título viral se usará para preparar un nuevo inóculo y administrarlo a otro grupo de animales naïf en el que será el siguiente pase. Este proceso se repetirá un mínimo de dos y un máximo de seis veces. Si en algún pase no se recuperara virus del pase previo, se administrará a los animales con el mismo pool de muestras en que se detectó virus vacunal por última vez. En total, el experimento *in vivo* tiene una duración máxima prevista de unos 126 días.**

Todos los ensayos 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 y la Comisión Nacional de Bioseguridad.

(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:

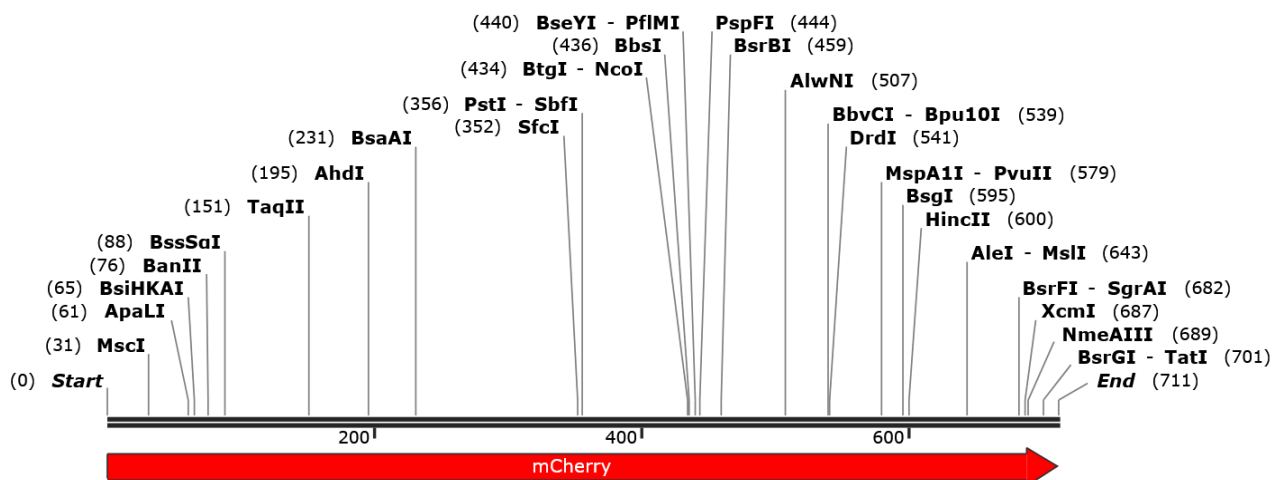
(Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto).

- 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.

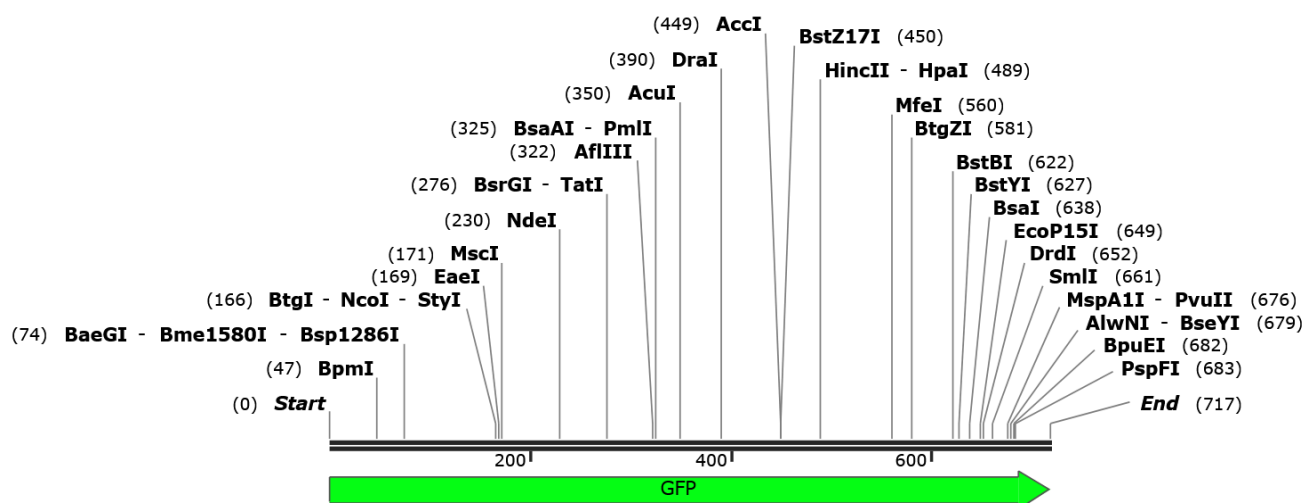
La cepa BA71 Δ CD2 Δ UK del virus de la peste porcina africana (VPPA) es un prototipo vacunal experimental. El VPPA afecta a cerdos domésticos y jabalíes, causando una patogenicidad caracterizada por una hemorragia interna generalizada que puede provocar mortalidades del 100% en cepas virulentas. Así, a partir de la cepa parental patógena BA71 se han eliminado mediante recombinación homóloga, la proteína CD2v codificada por el gen EP402R y la uridina quinasa (UK) codificada por el gen DP96R. Dichas deleciones hacen que el virus sea atenuado en su huésped natural, el cerdo. Este virus fue cedido por el Dr Manuel Borca (Plum Island Animal Disease Center, Estados Unidos).

Los organismos donantes en el caso del OMG BA71 Δ CD2 Δ UK son *Discosoma molle* (donante de mCherry que reemplaza a CD2v) y *Aequorea victoria* (donante de GFP que reemplaza a UK). La obtención del plásmido de transferencia codificando para los genes mCherry y GFP (utilizados como genes “reporter” en el OMG resultante) se hizo por síntesis *in vitro*.

Los vectores de transferencias utilizado fue el plásmido mCherry y GFP. Los mapas de los vectores originales se muestran en la figura adjunta. Dichos vectores no contienen ningún elemento regulatorio para eucariotas conocido



mCherry
711 bp



GFP
717 bp

El OMG resultante no muestra ningún cambio durante la replicación en cultivo celular (macrófagos alveolares porcinos, MAPs), 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

Tipo 2

Tipo 3

Tipo 4

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

- a) Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental).
- b) 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 y la valoración de una posible reversión a la virulencia. 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 a la espera de la finalización de los estudios en marcha 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.