



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

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA); Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC)

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

2) Debe señalarse si para la ejecución de esta actividad se recibe financiación del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica. Esta información es necesaria para determinar si la actividad se encuentra dentro del supuesto del artículo 3.2.b) de la Ley 9/2003 y, por lo tanto, la competencia recae en la Administración General del Estado.

SI NO

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

-Nombre de la convocatoria:

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

-Organismo financiador:

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

a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación: Existe autorización de uso de instalación tipo 3. La instalación de tipo 3 del CISA-INIA (notificación A/ES/00/I-01), en la que se va a llevar a cabo la actividad, ya ha sido autorizada con anterioridad por el Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente (CIOMG) mediante resolución con fecha 04/12/2001.

b) Número de referencia del expediente: A/ES/00/I-1.

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.



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad: Experimentación animal con animales transgénicos tipo 1 para investigación en enfermedades provocadas por la infección con priones. Los OMGs a emplear carecen del gen que expresa la PrP de ratón y en su lugar expresan el gen de la especie de interés, en algunos casos con polimorfismos de interés debido a que su presencia puede significar alteraciones de la susceptibilidad tras la infección con priones. Los ratones transgénicos que expresan la PrP de una especie determinada en ausencia de la PrP de ratón emulan las propiedades de la EET en la especie original de interés. Estos animales no se liberarán al medio ambiente, ni se comercializarán, se mantendrán en unas instalaciones de nivel 3 de contención biológica. El agente infeccioso no modifica el genoma del OMG dado que los priones carecen de información genética. En el caso de que se produzca infección en alguno de los OMGs a emplear, éste no tiene capacidad para transmitir la enfermedad ni a su potencial descendencia ni a sus compañeros de jaula, dado que la vía de infección eficiente es la intracraneal, la infección oral tiene una capacidad de transmisión muy limitada y se considera que no se transmiten por vía aérea. En concreto, se pretende caracterizar la susceptibilidad de diferentes líneas de ratones transgénicos frente a la infección con diferentes aislados de EETs representativos de diferentes tipos de priones, así como la posible evolución de los mismos frente a diferentes tratamientos previos a la inoculación. Las líneas de ratones a emplear, en cada caso, expresan la PrP de diferentes especies de las que hasta el momento no se disponían o nuevas mutaciones/polimorfismos presenten en la naturaleza y/o de especial interés y en las que hasta el momento no han realizado este tipo de ensayos de susceptibilidad. La caracterización de la susceptibilidad de nuevas líneas de ratones transgénicos que expresan nuevas secuencias de PrP de interés permitirá determinar su susceptibilidad frente a diferentes cepas de priones y las propiedades de la patología generada en el caso de que se produzca la transmisión del prion infeccioso. Así mismo, la modelización de las enfermedades genéticas humanas asociadas al prion facilita el diagnóstico y el estudio de posibles nuevas terapias para este tipo de enfermedades de difícil diagnóstico y de etiología fatal. Para ello se inoculan ratones transgénicos que expresan la proteína del prion (PrP) de diferentes especies:

- 226Q-DePrPTg: sobre expresa la PrP de ciervo en un fondo KO para la PrP de ratón.
- 226E-ElkPrPTg: sobre expresa la PrP de alce en un fondo KO para la PrP de ratón.
- 134G-CamPrPTg: sobre expresa la PrP de 134E-CamPrPTg en un fondo KO para la PrP de ratón.
- 114V-HuPrPTg: sobre expresa la PrP humana 114V en un fondo KO para la PrP de ratón.
- 129M-HuPrPTg: sobre expresa la PrP humana 129M en un fondo KO para la PrP de ratón.
- 129V-HuPrPTg: sobre expresa la PrP humana 129V en un fondo KO para la PrP de ratón.
- GoPrP-Tg: sobre expresa la PrP wt oveja/cabra en un fondo KO para la PrP de ratón.
- 222K-GoPrP-Tg: sobre expresa la PrP de cabra 222K en un fondo KO para la PrP de ratón.
- KO-Calpaína-Tg: carece de la expresión de la proteína calpaína.
- KO-Catepsina-Tg: carece de la expresión de la proteína catepsina.
- 110-BoPrP-Tg: sobre expresa la PrP de vaca en un fondo KO para la PrP de ratón.



En todos los casos en ausencia de la proteína del prion de ratón. No se emplearán OMGs distintos de los ratones modificados genéticamente. Los animales se inocularán con una colección de aislados representativos de diferentes cepas de encefalopatía espongiforme transmisibles así como controles negativos (sin enfermedad neurológica). De este modo, se pretende caracterizar la capacidad de las diferentes cepas de priones a ensayar para transmitirse a las diferentes especies y –en su caso- en el contexto de diferentes polimorfismos que pueden afectar a la susceptibilidad a la infección con priones. También se pretende determinar el papel de las proteasas calpaína y catepsina en la patología generada por los priones.

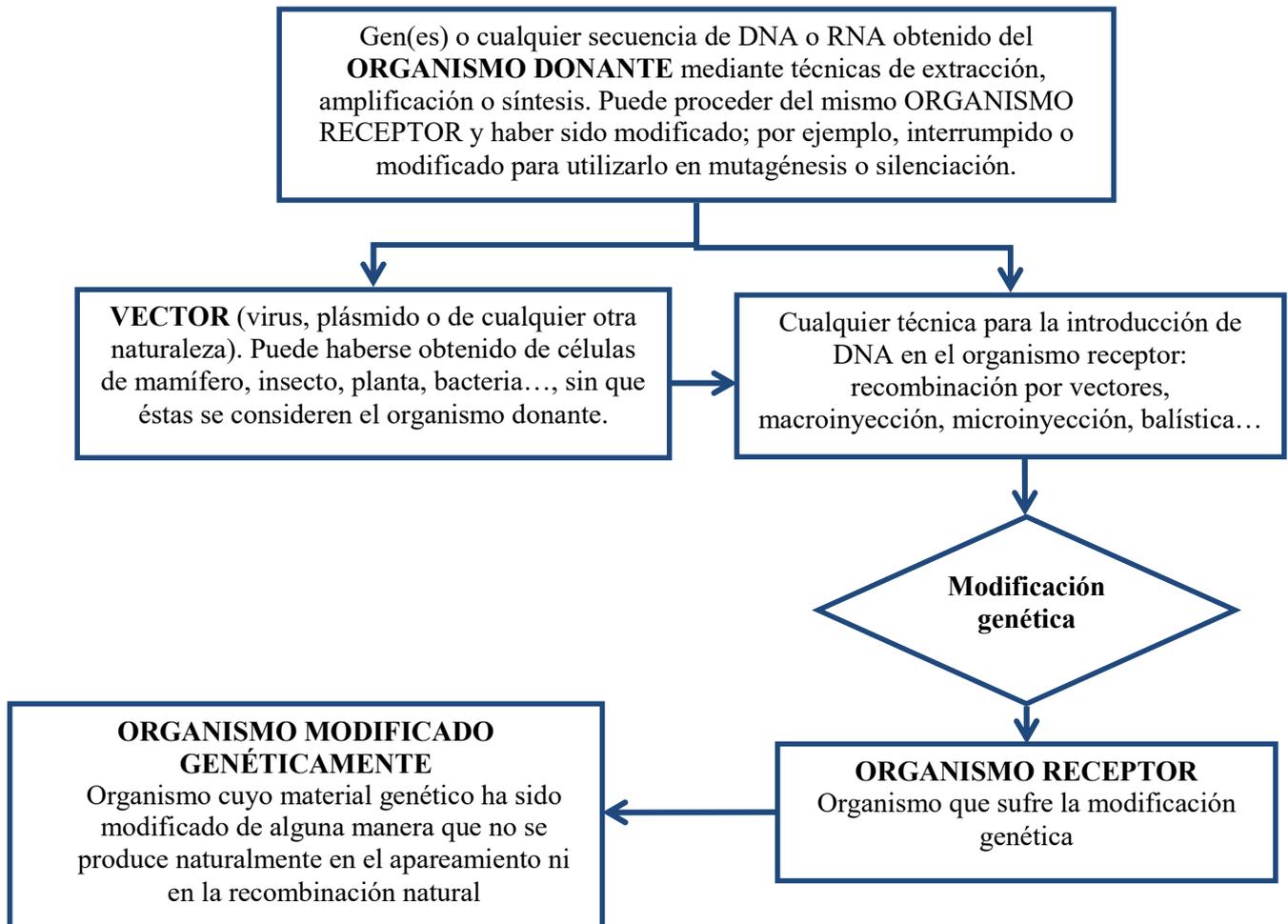
2) Clasificación de la actividad:

(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: *Mus musculus*

Taxonomía: *Muridae - Murinae*

Nombre común: ratón común

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento: PCR

b) Técnicas de identificación: PCR (amplificación específica del transgén mediante cebadores específicos).

c) Marcadores genéticos: la presencia del transgén

d) Marcadores fenotípicos: susceptibilidad.

e) Estabilidad genética: estable tras más de 10 generaciones.

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

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:

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? Se considera que está libre de agentes biológicos contaminantes relevantes. Por ejemplo, es posible la



presencia de microorganismos comensales habituales en las colonias de ratones de experimentación.

- 8) Experiencia adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor: El organismo receptor es el mamífero más empleado en experimentación animal.
- 9) Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente: Por las medidas de confinamiento existentes, resulta prácticamente imposible su liberación al medio ambiente. En este improbable caso, su supervivencia, y aún más su reproducción, sería muy complicada e improbable.

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

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

Se considera que los ratones no pueden crear este tipo de estructuras.

- i) esporas
- ii) endosporas
- iii) quistes
- iv) esclerocios
- v) esporas asexuales (hongos)
- vi) esporas sexuales (hongos)
- vii) otros, especifíquese.

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia: Las características intrínsecas de animal de laboratorio hacen muy improbable su supervivencia y reproducción en el medio ambiente.

d) Posibles nichos ecológicos: Comensalismo en zonas habitadas por el hombre.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: 21 días. Al ser ratones de laboratorio, su capacidad de supervivencia en un ecosistema natural es limitada e improbable.

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 o se desconoce

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos: Las históricamente habituales de esta especie. Se considera que es una especie invasora.



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

12) Hábitat natural del organismo: Comparten las zonas habitadas por humanos.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico:

Taxonomía: *Homo sapiens*, *Ovis orientalis aris*, *Capra aegagrus hircus*, *Odocoileus virginianus*, *Alces alces*, *Camelus dromedarius* y *Bos taurus*.

Nombre común: Humano, oveja, cabra, ciervo, alce, dromedario y vaca.

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

Fragmento de ADN genómico amplificado por PCR que codifica el gen PRNP (gen de la proteína del prion PrP).

3) Método de obtención:

a) Extracción

b) PCR

c) Síntesis *in Vitro*

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

Funciones relacionadas con la neuritogenesis, adhesión celular, memoria, cognición, neuroprotección y homeostasis del cobre. Confiere susceptibilidad a la infección con priones.

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

SI NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

i) seres humanos

ii) animales

iii) plantas

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

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



desarrollada y la susceptibilidad frente a la inoculación con priones dependen de la secuencia de la proteína del prion (PrP) expresada en el organismo receptor.

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

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

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

Las líneas de ratón que carecen de la expresión de la proteasa calpaína-1 o catepsina S han sido descritas previamente:

Yanwen Q et al., *Cardiovascular Research*. 2012. (96) 3: 401–410.

Azam M et al., *Molecular and Cellular Biology*, 2001, (21), 6: 2213-2220

2) Finalidad de la modificación genética: expresar la proteína del prion (PrP) de la especie de interés en ausencia de la proteína PrP del ratón.

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

Microinyección de embriones con el fragmento de ADN que incluye la secuencia de interés. Se produce inserción al azar del fragmento introducido.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

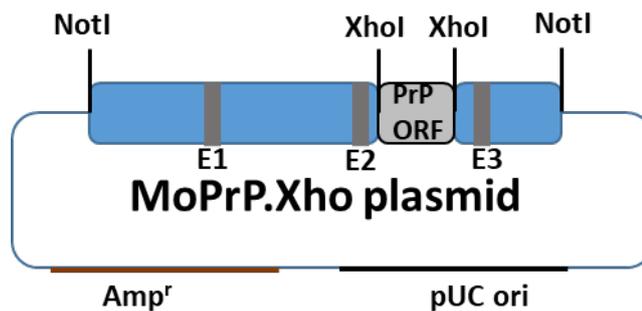
a) Tipo e identidad del vector:

pBluescript KS+ modificado: los sitios Sall y XhoI de la zona de policlonaje fueron retirados y en su lugar se incluyó un sitio NotI adicional para facilitar la escisión del fragmento bacteriano del vector y la purificación del fragmento de interés para su microinyección. Los detalles del vector se encuentran descritos en detalle en: Borchelt DR, Davis J, Fischer M, et al. A vector for expressing foreign genes in the brains and hearts of transgenic mice. *Genet Anal.* 1996;13:159-163.

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*):



Los sitios de restricción XhoI permiten modificar la ORF de la PrP de la especie que se desea incluir en el vector, en nuestro caso humana, de cabra o de oveja con potenciales polimorfismos relevantes. Los exones presentes en las zonas de regulación (tanto corriente arriba como corriente abajo) se señalan como E1, E2 y E3. Los sitios de restricción NotI permiten separar el fragmento de unas 12 kilobases (que se corresponde con el fragmento a microinyectar) del fragmento de 3 kilobases que se corresponde con el vector pBluescript.

d) Gama de hospedadores del vector: *Escherichia coli*

e) Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización. NO

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

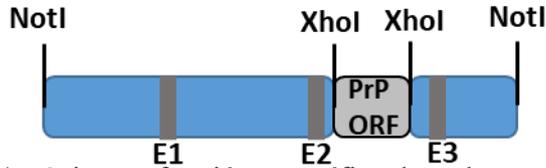
iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?

Sí, resistencia a ampicilina.

4) Información del inserto:

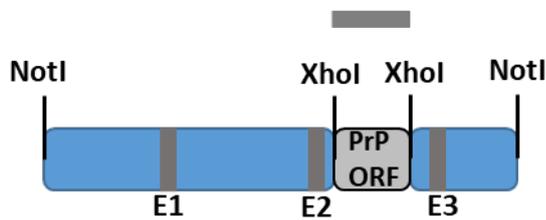
a) Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia:

Fragmento de 12 kilobases que contiene las zonas reguladoras de la expresión de la proteína del prion del ratón. Se ha eliminado la zona de la ORF de la proteína del prion del ratón y en su lugar se incluye la ORF de la proteína del prion de la especie de interés (humana, oveja o cabra). La ORF se encuentra entre dos dianas XhoI.



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

Origen: humano, oveja o cabra. Función: fase de lectura abierta del gen de la PrP de la especie de interés en cada caso



Origen: ratón. Función: zonas reguladoras de la expresión del gen de la PrP de ratón (tanto corriente arriba como corriente abajo)

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Para la manipulación de los plásmidos se emplean bacterias de *E. coli* transformadas mediante choque térmico.

Los ratones transgénicos se generan mediante microinyección de embriones de una célula obtenidas de hembras superovuladas (ratonas B6CBAf1).

d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto: no se identifican otros genes en el inserto empleado para generar cada ratón transgénico.

e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto: sólo se encuentran las zonas reguladoras de la expresión de la PrP del ratón.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí.

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

No. Se requiere el gen completo junto con las secuencias reguladoras de su expresión en el ratón.



h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.

No.



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

Los OMGs utilizados son de Tipo 1. Sólo tras la inoculación con priones pueden considerarse Tipo 3.

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?:

Sí

En caso afirmativo:

La inserción es al azar, por lo que se desconoce el número de copias, la localización cromosómica, las secuencias colindantes y la posible alteración de la expresión de genes colindantes.

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

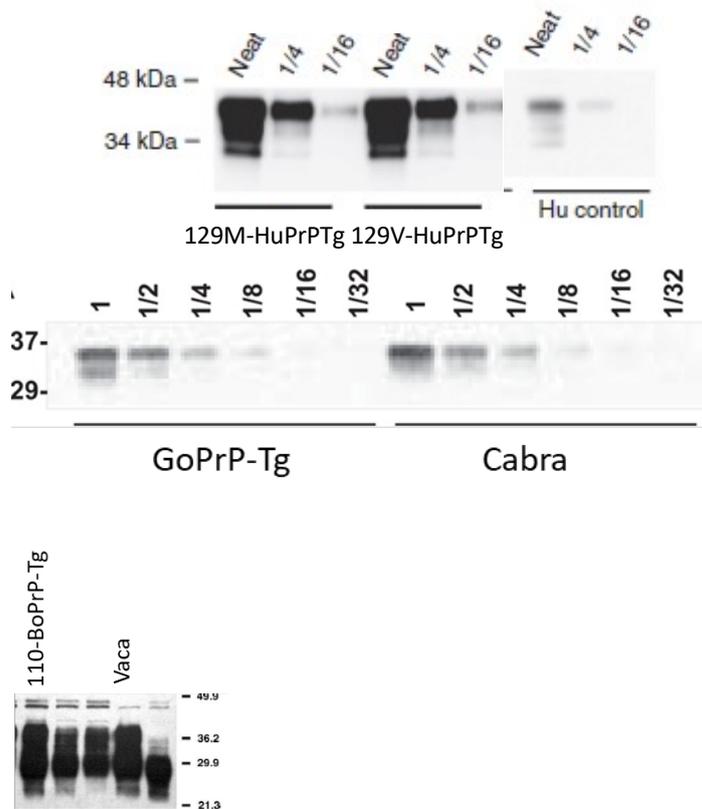
iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas

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)



Niveles de expresión de la PrP en cerebro de las líneas 129M-HuPrPTg, 129V-HuPrPTg, GoPrP-Tg y 110-BoPrP-Tg analizados mediante inmunoblot con anticuerpos específicos de la PrP y comparados con controles de cerebro humano (Hu-control) y de cabra. En los tres primeros se ha realizado dilución seriada a partir de muestras de cerebro homogeneizadas al 10%. Las masas moleculares relativas se indican en el lateral. Otras líneas transgénicas están aún en proceso de generación y/o caracterización.

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

- ¿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.
- ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese: No.
- ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar: Sí, pero sólo en el caso de ser infectado con un prion. La patogenicidad varía en función del prion generado en el OMG.
- ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese: No.
- ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese: No.



- f) Marcadores específicos del OMG: Presencia del transgén mediante PCR específica.
- 2) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):
- El OMG es estable, no se han detectado modificaciones tras más de 10 generaciones.
- 3) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos: No.
- 4) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: PCR.
- b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: No se han determinado.

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:
- b) Número de plantas:
- c) Número de animales: 2004.
- 3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada: desde el 01/04/2023 hasta el 31/03/2028.
- (Debe concretarse lo más posible la duración de la actividad por ejemplo, teniendo en consideración la duración de la financiación de los proyectos a los que están asociados las actividades con los OMG).*
- 4) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados: Caracterizar la situación del scrapie clásico en Islandia como un modelo de enfermedad del prion para el resto del planeta. También se pretende determinar el potencial zoonótico del scrapie clásico circulante.
- 5) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa (*señalar nombre y ubicación*), y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG. En el caso de centros españoles, indicar el número de notificación si se conoce: no procede de otro centro. Pertenece al CISA.



- 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*):
- 7) Descripción de los métodos de manejo de los OMG (*incluyendo descripción de las fases de cultivo y concentración máxima de OMG en el cultivo*): Los OMG se crían/mantienen en un box del animalario de la zona de nivel 3 de biocontención del CISA, donde se consideran OMG de tipo 1. Para su inoculación, se trasladan a otro box con medidas adicionales de bioseguridad para su inoculación con priones.
- 8) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse: Las establecidas en el CISA para la manipulación de ratones inoculados con priones.

Existen protocolos específicos y zonas de seguridad establecidas para el trabajo con estos OMG una vez inoculados con priones. Todas las manipulaciones para la obtención del OMG se realizarán en cabinas de seguridad biológica dentro del laboratorio de nivel 3 del CISA, cuyo acceso se encuentra restringido al personal ajeno al proyecto o seguridad biológica. La zona de contención biológica de 10.824 m², posee unas características arquitectónicas y funcionales reconocidas internacionalmente para garantizar la bioseguridad. La característica principal del laboratorio es proporcionar un grado de estanqueidad total para evitar la liberación al exterior de cualquier agente patógeno sobre el que se estén llevando a cabo trabajos de investigación. Para asegurar unas correctas medidas de seguridad, el Centro está diseñado siguiendo aspectos arquitectónicos, funcionales y buenas pautas de trabajo adecuados e integrados. Dentro de los aspectos arquitectónicos y estructurales, el Centro está construido en hormigón armado hidrófugo, cuyo interior está pintado con pintura epoxídica para posibilitar las operaciones de descontaminación. Existen también ventanas blindadas de seguridad. Todas las entradas a boxes y diferentes zonas o laboratorios, así como las de emergencia, presentan puertas con cerradura de seguridad y ajuste neumático. El Centro presenta una estructura tipo “sándwich” donde las zonas de trabajo (laboratorios, animalario y entrada y salida de personal) se localizan en una planta intermedia. En la planta superior se encuentra un sistema de filtración de alta eficacia del aire mientras que la planta inferior está habilitada para los procesos de gestión de residuos sólidos y efluentes y para la entrada y salida de animales y materiales mediante sistemas SAS y airlocks. Para asegurar un funcionamiento correcto incluso bajo situaciones de emergencia, todos los dispositivos de seguridad se

² Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

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



encuentran instalados de forma redundante (duplicados) o en algunos casos por triplicado. Dentro de las características funcionales, se encuentran las siguientes:

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

□ Establecido en toda la zona de biocontención existe un mantenimiento de presión negativa respecto a la atmosférica en gradiente diferencial unidireccional de flujo continuo en los laboratorios y en cascada en los boxes de animales experimentación, con pasos de entre 25 y 35 Pa, generado en extracción dinámica, consiguiendo que el aire siempre circule de zonas teóricamente menos contaminadas a más contaminadas. El 100% del aire que entra vuelve a salir por lo que en ningún momento se recircula el aire.

□ El aire de salida es filtrado mediante un sistema simple o doble seriado de filtros H14 HEPA (High Efficiency Particulate Air) consistente en una malla filtrante con paso de poro de 99.995% para partículas de máximo poder de penetración en superficie (MPPS) (0.12 μm -0.20 μm). Existen diferentes zonas de filtración de salida independientes, correspondientes a distintas secciones del laboratorio; de esta forma en caso de problemas puede evaluarse la efectividad de la zona afectada por separado.

□ El control y tratamiento de residuos líquidos generales tiene lugar en la planta inferior del Centro. Con carácter previo se realiza una separación del 100% de los sólidos conformados presentes en el efluente y el 50% de los sólidos en suspensión. Posteriormente se trata el efluente mediante una esterilización fisicoquímica en 3 reactores de 3 m³ controlando temperatura, presión y pH. La temperatura se eleva por encima de 136°C durante un tiempo aproximado de 22 minutos. La fase química se realiza mediante la inyección de peróxido de hidrógeno durante el tratamiento térmico. Existe un sistema adicional de tratamiento de efluentes en casos de emergencia por tratamiento químico.

□ Para el control y tratamiento de sólidos biocontaminados existe un horno crematorio pirolítico, diferentes autoclaves de vapor y la presencia de sistemas de descontaminación química (SAS o airlocks) a base de peróxido de hidrógeno gas o mediante ducha química superficial.

A pesar de todos los recursos tecnológicos y de ingeniería, el buen funcionamiento del área de biocontención se culmina con una correcta actuación del personal trabajador correctamente formado, adoptando de forma obligada medidas de prevención de riesgos laborales. Controles de entrada y salida del laboratorio. La entrada al laboratorio está controlada y supervisada rigurosamente. Sin acreditación correspondiente, no está permitido el acceso. Los visitantes han de ir acompañados en todo momento por el personal de Seguridad Biológica. Una vez en el interior es necesario pasar por un vestuario para liberarse de toda la ropa y objetos personales antes de acceder a la zona biocontenida. El acceso a la zona de Alta Contención Biológica (NCB3), presenta un riesgo especial para los trabajadores por lo que a esta zona sólo puede acceder personal especialmente formado y autorizado para trabajar en estas condiciones. Una serie de vestuarios a la entrada y duchas a la salida aseguran la descontaminación obligatoria del personal. Cada persona que abandone el laboratorio deberá



seguir escrupulosamente unas pautas de descontaminación, entre las que se incluye la obligación de descontaminación por arrastre y dilución gracias a la toma de una ducha automática de agua de 3 minutos de duración.

Bajo ningún concepto es posible extraer cualquier objeto del interior del laboratorio sin la descontaminación pertinente.

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

- Las normas que señalan la protección de las heridas y lesiones de las manos antes de iniciar la actividad laboral.
- Las normas que limitan o prohíben el trabajo directo con animales y/o manejo de equipos contaminados al personal que presenta lesiones cutáneas que no se pueden cubrir.
- La utilización constante de guantes de protección en la manipulación de muestras biológicas, objetos, materiales o superficies contaminadas con fluidos biológicos, etc.
- La prohibición de comer, beber, fumar, aplicarse cosméticos o llevar lentes de contacto en las áreas de trabajo.
- La obligación del uso de batas de protección, mascarillas y protección ocular (entre otras) en aquellas operaciones que pueden implicar salpicaduras de sangre o fluidos.
- El seguimiento estricto de las instrucciones que contemplan la actuación en caso de accidente o incidente en el que intervenga la presencia de un agente biológico.
- El seguimiento de las situaciones de riesgo adicional que podría suponer a aquellos trabajadores especialmente sensibles (patologías previas, trastornos inmunitarios, embarazo, lactancia, discapacidad, etc.).
- El uso de ropa de trabajo especial como pijamas, camisetas, monos, ropa interior, zuecos o zapatillas, botas, etc.
- El cambio de ropa en los accesos y salidas a la zona de alta seguridad.

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

Establecimiento de cuarentenas. Finalmente, y en cumplimiento de la legislación y normativa internacional de la OIE y la FAO, todo trabajador de la zona de Contención está sujeto a cuarentenas especiales entendiendo éstas como el espacio de tiempo que transcurre entre el abandono de la zona de Riesgo y todo contacto con animales sensibles de contraer enfermedades desarrolladas/reproducidas en el Centro.

Estas cuarentenas varían entre los 3 y 5 días como mínimo. De igual manera que con los equipos de protección individual, el trabajador deja constancia documental de cumplimiento de esta circunstancia.



El box de experimentación donde se van a desarrollar las actividades con los OMGs aquí descritos además de las medidas reflejadas ofrece:

- Inactivación de residuos en lejía al 50%.
- Inactivación con lejía/desinfección de contenedores en el box/duchas del box.
- Autoclaves de doble frontera animalario/laboratorios y 2º interior NCB3/ exterior NCB3.
- Validaciones microbiológicas de todos los procesos de biodescontaminación por gas y calor mediante *Geobacillus stearothermophilus* en población de 10^6 .
- Equipo de 8 personas de técnicos especializados de seguridad biológica.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales: El CISA está ubicado a 700 m de la localidad de Valdeolmos que presenta una baja densidad de población (< 1.000 habitantes). No existen próximos, explotaciones ganaderas, cotos, reservas de caza. El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo al CISA es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

El laboratorio está equipado con medios e infraestructura de biocontención superiores a los establecidos para las operaciones confinadas de Tipo 3, en la legislación de aplicación y normativas nacionales e internacionales.

La Instalación se encuentra validada por empresa externa, inspeccionada y declarada como nivel 3 de contención biológica por el Instituto Regional de Seguridad y Salud en el Trabajo de la CAM, auditada interna y externamente en riesgo biológico por empresas ajenas, cualificada anualmente por empresa especializadas en CSB y filtración y verificada por el equipo propio de seguridad biológica periódicamente de forma rutinaria y frente a operaciones de mantenimiento correctivo.

Se dispone de procedimientos de bioseguridad por actividades tales como, investigadores, animalario, seguridad biológica, mantenimiento, limpieza, vigilancia perimetral y equipo médico, donde se especifican las normas de bioseguridad para descontaminaciones, gestión de residuos, operaciones de mantenimiento correctivo, envíos y recepción de muestras, transporte interior, uso de airlocks y SAS, etc.

Se dispone de un programa mensual, bimestral, trimestral, cuatrimestral, semestral y anual de actuaciones de verificación y seguimiento de instalaciones críticas.

Se dispone de documentos de control de acciones, trabajos y seguimiento de parámetros de bioseguridad.

Se dispone de estación informática de control y seguimiento de parámetros esenciales de bioseguridad e infraestructura de mantenimiento redundante (interior NCB3- exterior).

Se dispone de estación informática de seguimiento de parámetros para tratamiento de efluentes redundante (interior NCB3 y exterior).

Se dispone de redundancia en suministro eléctrico con dos líneas de alta tensión, dos transformadores de baja autoconmutados, dos grupos electrógenos y dos UPS /SAI.



Todas las operaciones de mantenimiento preventivo se encuentran verificadas.

Se realiza tratamiento de residuos “in situ”.

La instalación dispone de un plan de emergencias de actuación en caso de accidente biológico y plan de evacuación sobre incidentes en incendios, aviso de bomba, accidente biológico químico y evacuación de accidentados

- 2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes: El habitual en la Campiña de Madrid: Clima continental-mediterráneo con primaveras y otoños húmedos e inviernos y veranos secos. Con fuerte gradiente de temperaturas estacional. Viento predominante N.O.
- 3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista: Boxes de ratones inoculados con priones que se encuentran en el edificio del animalario del CISA. Las operaciones indicadas se desarrollarán en un box de experimentación en contención biológica de nivel 3 (NCB3). Toda la Instalación se encuentra autorizada para trabajos con OMG Tipo 3 (A/ES/00/I-1) con fecha de Resolución de 5 de diciembre de 2000 por la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental; Subdirección General de Impacto Ambiental y Prevención de Riesgos.

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

- 1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio: Existen protocolos específicos de obligatorio cumplimiento. Algunos de ellos son específicos para los trabajos con priones:
 - Prevención y protección para trabajos con priones.
 - Procedimiento de gestión de equipos de protección individual NCB3.
 - Procedimiento para la retirada de guantes de nitrilo y manguitos en trabajos bajo CSB.
 - Procedimiento para la retirada de guantes de nitrilo.
 - Procedimiento para la colocación y retirada de mascarillas.
 - Procedimiento para la colocación y retirada de EPI en los laboratorios de priones de Alta y Baja infectividad.
- 2) Formación del personal adscrito: El personal actuante ha sido formado antes de iniciar la actividad mediante un curso teórico práctico sobre Bioseguridad en contención 3 en el laboratorio y Animalario específico. Fueron sometidos a test de comprensión. El personal recibe un curso de reciclaje en bioseguridad anualmente. El acceso a los boxes de ratones inoculados con priones y a los laboratorios de manipulación de priones se realiza exclusivamente por personal experimentado y formado específicamente para tal fin.
- 3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación: Limpieza: Se dispone de personal entrenado específico de limpieza tanto para áreas NCB3 comunes como específicas de trabajo con priones donde se cuenta con la colaboración de personal especializado en bioseguridad. Se dispone de personal entrenado y acreditado en trabajos de animalario. Se dispone de procedimientos de desinfección, descontaminación y esterilización que son llevados a cabo por personal técnico especializado en bioseguridad (Técnicos Superiores de Laboratorio y Titulados Superiores en Ciencias).



- 4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento: Llevado a cabo por personal especializado en mantenimiento 24horas / 365 días año.
- 5) Programas de inspección y control del confinamiento: Llevado a cabo por técnicos especializados en Seguridad Biológica.

X. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1) Encargado de la gestión de residuos:

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

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

2) Inactivación de residuos: método, forma final, destino de cada uno de los tipos de residuos generados: La forma final es la incineración de los cadáveres.

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

- 1) Condiciones en las que podría producirse un accidente: Indicadas en el Plan de Evacuación establecido.
- 2) Equipamiento de seguridad (especifíquese): Reflejados en los procedimientos detallados en el punto IX.
- 3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores: Manual de bioseguridad para animalario para trabajos con priones. Plan de Evacuación. Procedimientos de Bioseguridad específicos para priones en animalario.
- 4) Planes de emergencia: Presentado en Protección Civil y expuesto en el acceso a la zona NCB3 para información a personal específico. Las acciones técnicas son llevadas a cabo por personal CISA-INIA de Dirección, de Seguridad Biológica y de Mantenimiento para control o parada de equipamiento auxiliar (calderas, bombas, equipos de frío o torres de refrigeración, etc.), bajo indicación y supervisión del Jefe de Servicio de Seguridad Biológica.



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

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

1) Entidad:

Nombre: Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA); Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA); Ministerio de Ciencia e Innovación
Dirección postal: Carretera de Algete a El Casar de Talamanca s/n; Valdeolmos - Alapardo; 28130 Madrid

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:

Experimentación animal con animales transgénicos tipo 1 para investigación en enfermedades provocadas por la infección con priones. Los OMGs a emplear carecen del gen que expresa la PrP de ratón y en su lugar expresan el gen de la especie de interés, en algunos casos con polimorfismos de interés debido a que su presencia puede significar alteraciones de la susceptibilidad tras la infección con priones. Los ratones transgénicos que expresan la PrP de una especie determinada en ausencia de la PrP de ratón emulan las propiedades de la EET en la especie original de interés. Estos animales no se liberarán al medio ambiente, ni se comercializarán, se mantendrán en unas instalaciones de nivel 3 de contención biológica. El agente infeccioso no modifica el genoma del OMG dado que los priones carecen de información genética. En el caso de que se produzca infección en alguno de los OMGs a emplear, éste no tiene capacidad para transmitir la enfermedad ni a su potencial descendencia ni a sus compañeros de jaula, dado que la vía de infección eficiente es la intracraneal, la infección oral tiene una capacidad de transmisión muy limitada y se considera que no se transmiten por vía aérea. En concreto, se pretende caracterizar la susceptibilidad de diferentes líneas de ratones transgénicos frente a la infección con diferentes aislados de EETs representativos de diferentes tipos de priones, así como la posible evolución de los mismos frente a diferentes tratamientos previos a la inoculación. Las líneas de ratones a emplear, en cada caso, expresan la PrP de diferentes especies de las que hasta el momento no se disponían o nuevas mutaciones/polimorfismos presenten en la naturaleza y/o de especial interés y en las que hasta el momento no han realizado este tipo de ensayos de susceptibilidad. La caracterización de la susceptibilidad de nuevas líneas de ratones transgénicos que expresan nuevas secuencias de PrP de interés permitirá determinar su susceptibilidad frente a diferentes cepas de priones y las propiedades de la patología generada en el caso de que se produzca la transmisión del prion infeccioso. Así mismo, la modelización de las enfermedades genéticas humanas asociadas al prion facilita el diagnóstico y el estudio de posibles nuevas terapias para este tipo de enfermedades de difícil diagnóstico y de etiología fatal. Para ello se inoculan ratones transgénicos que expresan la proteína del prion (PrP) de diferentes especies:

- 226Q-DePrPTg: sobre expresa la PrP de ciervo en un fondo KO para la PrP de ratón.
- 226E-ElkPrPTg: sobre expresa la PrP de alce en un fondo KO para la PrP de ratón.
- 134G-CamPrPTg: sobre expresa la PrP de 134E-CamPrPTg en un fondo KO para la PrP de ratón.
- 114V-HuPrPTg: sobre expresa la PrP humana 114V en un fondo KO para la PrP de ratón.
- 129M-HuPrPTg: sobre expresa la PrP humana 129M en un fondo KO para la PrP de ratón.
- 129V-HuPrPTg: sobre expresa la PrP humana 129V en un fondo KO para la PrP de ratón.
- GoPrP-Tg: sobre expresa la PrP wt oveja/cabra en un fondo KO para la PrP de ratón.



- 222K-GoPrP-Tg: sobre expresa la PrP de cabra 222K en un fondo KO para la PrP de ratón.
- KO-Calpaína-Tg: carece de la expresión de la proteína calpaína.
- KO-Catepsina-Tg: carece de la expresión de la proteína catepsina.
- 110-BoPrP-Tg: sobre expresa la PrP de vaca en un fondo KO para la PrP de ratón.

En todos los casos en ausencia de la proteína del prion de ratón, excepto en las líneas KO-Calpaína-Tg y KO-Catepsina-Tg que carecen de la expresión de las proteasas calpaína y catepsina. No se emplearán OMGs distintos de los ratones modificados genéticamente. Los animales se inocularán con una colección de aislados representativos de diferentes cepas de encefalopatía espongiforme transmisibles, así como controles negativos (sin enfermedad neurológica). De este modo, se pretende caracterizar la capacidad de las diferentes cepas de priones a ensayar para transmitirse a las diferentes especies y –en su caso- en el contexto de diferentes polimorfismos que pueden afectar a la susceptibilidad a la infección con priones. También se pretende determinar el papel de las proteasas calpaína y catepsina en la patología generada por los priones.

Duración prevista de la actividad: cinco años.

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

III. EVALUACIÓN DE RIESGO

(Para llevar a cabo dicha evaluación se tendrá en cuenta el procedimiento establecido en el Anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo).

(En el caso de actividades de tipo I 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.

En función de las características del OMG no se identifica ninguna propiedad nociva dado que sólo



cuando el OMG haya sido inoculado con priones podría ser potencialmente infeccioso. Por ello, el mantenimiento y manipulación de los OMG se realizará dentro de instalaciones específicas para el manejo de priones con medidas de bioseguridad de nivel 3. El confinamiento en una instalación con nivel de seguridad 3 implica que no deberían de tener ningún efecto sobre el medio ambiente.

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.

Todas las actividades que implican la manipulación, propagación y administración de priones se encuentran confinadas en nivel de seguridad BSL3. La exposición humana se reduce al máximo mediante el empleo de medidas de protección individual para el personal del laboratorio involucrado, junto con la manipulación obligatoria en instalaciones exclusivas habilitadas a tal efecto en nivel de seguridad BSL3. La experimentación animal se lleva a cabo con las mismas medidas de protección personal en boxes de uso exclusivo. Por todo ello, se estima que la probabilidad de que se produzcan efectos nocivos en función de la actividad prevista, tanto para los humanos como para el medio ambiente.

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

Los OMG que van a ser utilizados son clasificados como tipo I, puesto que su modificación consiste exclusivamente en la inserción de un transgén de diversas especies con el fin de lograr un aumento en la susceptibilidad a la enfermedad y reducir así el período de incubación.

Sólo al inocular con priones podría considerarse necesario un nivel de confinamiento tipo 3.

Por ello, las instalaciones donde van a estar ubicados los animales inoculados cumplen con un nivel de bioseguridad nivel 3.

5) Determinación del riesgo en el caso de que se produzca una liberación accidental:

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



- a) Información adicional relativa a la ubicación de la instalación (proximidad a fuentes de peligro potenciales, condiciones climáticas predominantes, etc.). El Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) está ubicado a 700 metros de la localidad de Valdeolmos. Valdeolmos es un municipio de bajo número de habitantes (< 1000). Se asienta en una penillanura a una altitud de 685 m sobre el nivel del mar rodeado de tierras de cultivo de secano (trigo, centeno, avena) y no se encuentra cercana ninguna explotación ganadera. Es zona CEPA. El centro presenta un conjunto de instalaciones reunidas en un solo edificio subdividido en área administrativa, zona NCB2 y zona NCB3. Actualmente trabajan alrededor de 170 personas en las diferentes áreas.
- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente. Indicadas en el Plan de emergencia y evacuación.
- c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales. Explicados anteriormente y desarrollados en el Plan de emergencias y evacuación y en la parte A (anexo de documentación correspondiente a la solicitud).
- d) Planes de emergencia. El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud.