



**PARTE A Y C**

DIRECCION GENERAL CALIDAD Y  
EVALUACIÓN AMBIENTAL

**Actividades de  
tipo 3 y 4**

COMISIÓN NACIONAL DE  
BIOSEGURIDAD

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

**I. INFORMACIÓN GENERAL**

**1. Responsables de la actividad**

**a. Entidad**

Nombre: **IRTA-CReSA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries)**

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**

Correo electrónico: **[josep.usall@irta.cat](mailto:josep.usall@irta.cat)**

**c. Responsable científico de la actividad**

Nombre y apellidos: **Fernando Rodriguez González**

NIF: **13.763.889-E**

Cargo: **Investigador**

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

Correo electrónico: **[fernando.rodriguez@irta.cat](mailto:fernando.rodriguez@irta.cat)**

**d. Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad**

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

NIF: **35.082.196-C**

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

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

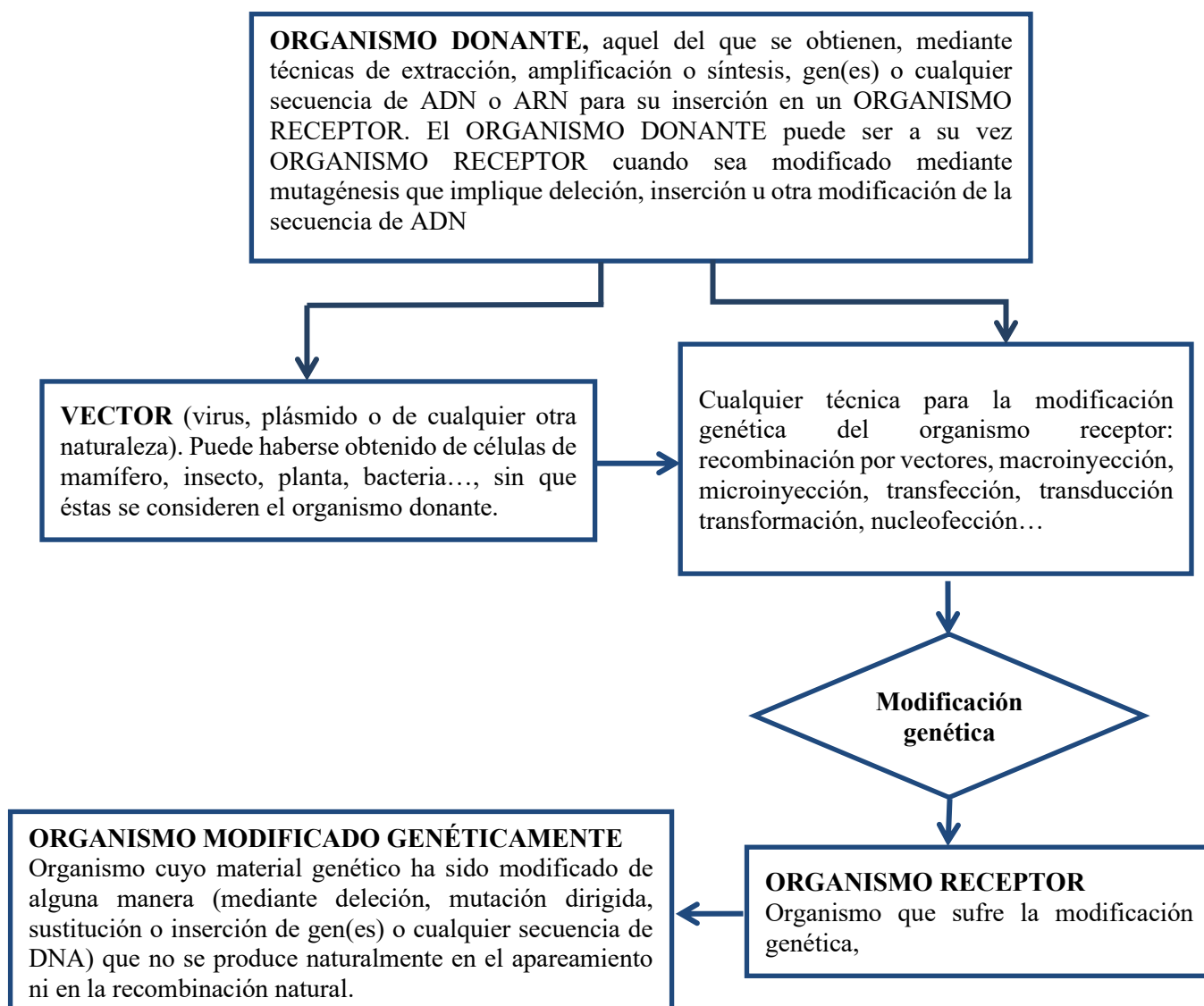
Correo electrónico: **[xavier.abad@irta.cat](mailto:xavier.abad@irta.cat)**

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

**Xavier Abad**



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





## II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

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

SI  NO

Si la respuesta a la pregunta anterior es **SI**, debe justificarlo especificando<sup>1</sup>:

- Nombre de la convocatoria:

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

Otro tipo de financiación<sup>2</sup>

2. Instalación donde se va a desarrollar la actividad (si la instalación no está autorizada, cumplimente el Formulario Parte B):

- Número de referencia de la notificación de la instalación (A/ES/./I-..):

A/ES/16/ I-06

- Fecha de autorización de la instalación:

27 mayo 2016

Si el OMG no se genera en la instalación<sup>3</sup>:

- Nombre de la instalación de origen del OMG:

- Número de referencia de la notificación de la actividad en el caso de que se realice en España (A/ES/./..)

<sup>1</sup>TASAS

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

<sup>2</sup>Se deberá aportar la información que permita verificar esta circunstancia.

<sup>3</sup>Debe tenerse en cuenta que, si los OMG proceden de otra instalación española, ésta deberá haber cumplido con los requisitos establecidos en la legislación española de OMG.



- Número de referencia de la notificación de la instalación en el caso de que se ubique en España (A/ES/.../I-..):

- Explicar cómo se realiza el transporte del OMG desde la instalación de origen teniendo en cuenta la legislación aplicable (especificar tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado)<sup>4</sup>:

### 3. 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 vista 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 (BA71ΔCD2) 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). 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.

Dentro de este contexto, el objetivo de esta propuesta experimental es el de evaluar el efecto combinado inmunoprotector contra la PPA del prototipo vacunal BA71ΔCD2 adyuvantado con una bacteria comensal viva aislada del jabalí verrugoso (*Phacochoerus africanus*), pendiente de patente y en adelante denominada como CReSHog<sup>®</sup>, y de su fracción libre de bacteria.

Para ello, se vacunarán intranasalmente (IN) 3 grupos de 6 cerdos domésticos (*Sus crofa*) con 10<sup>6</sup> pfu/animal del prototipo vacunal BA71ΔCD2. Uno de estos grupos, será adyuvantado con la fracción libre de bacteria de CReSHog<sup>®</sup>, otro grupo será adyuvantado con la bacteria CReSHog<sup>®</sup> y el tercer grupo será adyuvantado con PBS. Un cuarto grupo de 6 cerdos no vacunados será inoculado con CReSHog<sup>®</sup> y su fracción libre de bacteria, como control. Al cabo de 21 días de la vacunación (21dpv), los 24 animales serán inoculados con la dosis letal de 10<sup>5</sup>HAU/animal de la cepa Georgia2007 de VPPA.

Durante el experimento se obtendrán diversas muestras (hisopo nasal, sangre, sangre-EDTA y saliva) a 0dpv, 7dpv, y 16 dpv, y a 0 días post-desafío (dpc), 6dpc, 12dpc, 19dpc y 22dpc. Los

<sup>4</sup> Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- (ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas) del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones.
- Reglamento (CE) N° [1/2005](#) del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas [64/432/CEE](#) y [93/119/CE](#) y el Reglamento (CE) N° [1255/97](#). Ley [32/2007](#), de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE núm. 268, 8.11.2007)
- 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/>
- [Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances](#) Edición bianual de la OMS



muestras se harán para poder medir la respuesta inmune generada y evaluar la protección conferida siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio. En necropsia, a día 22dpc, se tomarán muestras de diferentes tejidos (mucosa nasal, linfonodos gastrohepático, submandibular y retrofaríngeo, tonsila, GALT, pulmón y bazo). 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 de Catalunya) y el Comité de Bioseguridad del IRTA y la Comisión Nacional de Bioseguridad.

#### 4. 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 3

Tipo 4

### III. INFORMACIÓN RELATIVA A LA OBTENCIÓN DEL OMG

#### 1. Organismo receptor del cual deriva el OMG:

- |                          |                                     |                                |
|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| Células humanas/primates | <input type="checkbox"/>            | Detallar las líneas celulares: |
| Células: otras           | <input type="checkbox"/>            | Detallar las líneas celulares: |
| Animal                   | <input type="checkbox"/>            |                                |
| Planta                   | <input type="checkbox"/>            |                                |
| Bacteria                 | <input type="checkbox"/>            |                                |
| Hongo                    | <input type="checkbox"/>            |                                |
| Virus                    | <input checked="" type="checkbox"/> |                                |
| Protozoos                | <input type="checkbox"/>            |                                |

-Especificar el nombre científico y común:

VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA) - cepa Ba71; Familia Asfarviridæ, género Asfivirus. Nombre común: Virus de la Peste Porcina Africana

#### a. Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- i) 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
- ii) Técnicas de identificación: PCR
- iii) Marcadores genéticos: PCR de las proteínas p72 o p30
- iv) Marcadores fenotípicos: No aplica
- v) Estabilidad genética: Estable a largo plazo



**b.** La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

SI

– Especificar cómo se sabe que está libre de agentes biológicos contaminantes.

No aplica

NO

– Especificar si se conocen o se sospecha cuáles pueden ser.

**c.** Modificación genética anterior:

SI

– Describir:

– Cambios en virulencia, patogenicidad, tropismo, toxicidad, otros efectos.

NO

**d.** Se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos intra/extracelulares (Asignar grupo de riesgo conforme al anexo II de Real Decreto 664/1997 tras evaluación del riesgo específica):

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

SI

Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros



– Posibles efectos alérgicos y/o tóxicos (describir):

No aplica.

NO

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

SI

NO

f. Experiencia previa adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor:

Dependiendo de la dosis administrada se puede observar virulencia.

g. Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:

i) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?:

SI

- Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

esporas

endosporas

quistes

esclerocios

esporas asexuales (hongos)

esporas sexuales (hongos)

otros, especifíquese

NO

ii) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

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/listadeproductosdeeficaciaprobadafrentealvirusdelappajunio\\_tcm30-510548.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/listadeproductosdeeficaciaprobadafrentealvirusdelappajunio_tcm30-510548.pdf)). 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

iii) Posibles nichos ecológicos:

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

iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica.



**h.** Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

No aplica.





ii) 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.

i. 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.

j. Hábitat natural del organismo:

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

2. Organismo(s) donante(s). No completar el punto si no existiese organismo donante o si es el mismo que el organismo receptor.

- |           |                                     |
|-----------|-------------------------------------|
| Humanos   | <input type="checkbox"/>            |
| Animal    | <input type="checkbox"/>            |
| Planta    | <input type="checkbox"/>            |
| Bacteria  | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Hongo     | <input type="checkbox"/>            |
| Virus     | <input type="checkbox"/>            |
| Protozoos | <input type="checkbox"/>            |

-Especificar el nombre científico y común:

*Escherichia coli*. Taxonomía: Reino: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Clase: Gamma Proteobacteria; Orden: Enterobacteriales; Familia: Enterobacteriaceae; Género: Escherichia; Especie: *Escherichia coli*.

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI  NO

b. La cepa/línea celular donante: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

SI

– Especificar cómo se sabe que está libre de agentes biológicos contaminantes.

No aplica, cepa comercial.

NO

– Especificar si se conocen o se sospecha cuáles pueden ser.

c. Modificación genética anterior:

SI

– Describir:



[ ]

- Cambios en virulencia, patogenicidad, tropismo, toxicidad, otros efectos.

[ ]

- d.** Se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos intra/extracelulares. (Asignar grupo de riesgo conforme al anexo II de Real Decreto 664/1997 tras evaluación del riesgo específica):

*Escherichia coli* forma parte de la microbiota intestinal de muchas especies animales, incluyendo la humana. *Escherichia coli* podría actuar como patógeno oportunista.

SI  Para:

- Humanos
- Animales
- Plantas
- Otros

- Posibles efectos alérgicos y/o tóxicos (describir):

[ ]

NO

- e.** En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI  NO

- f.** Tipo de material genético obtenido del organismo donante (gen codificante o fragmento del mismo. miRNA, lncRNA, etc.):

ADN gen gusA (gen "reporter").

- g.** Método de obtención:

- Extracción
- PCR
- Síntesis *in vitro*

- h.** Función del gen/genes o secuencias en el organismo donante:

Metabolismo de los carbohidratos en *E. coli*

- 3.** ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

No.



#### IV. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1. Objetivo de la modificación genética (sobreexpresión, silenciamiento, otros):

Atenuación de la patogenicidad, de cara a ser utilizado como vacuna (deleción de un gen vírico e inserción del gen "reporter" de origen bacteriano en su lugar).

2. Tipo de modificación genética:

- Inserción de material genético
- Deleción de material genético
- Sustitución de bases
- Otros, especifique:

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

- Transformación
- Electroporación
- Macroinyección
- Microinyección
- Infección
- Transfección
- Fusión celular

Otros, especifique:

Recombinación

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

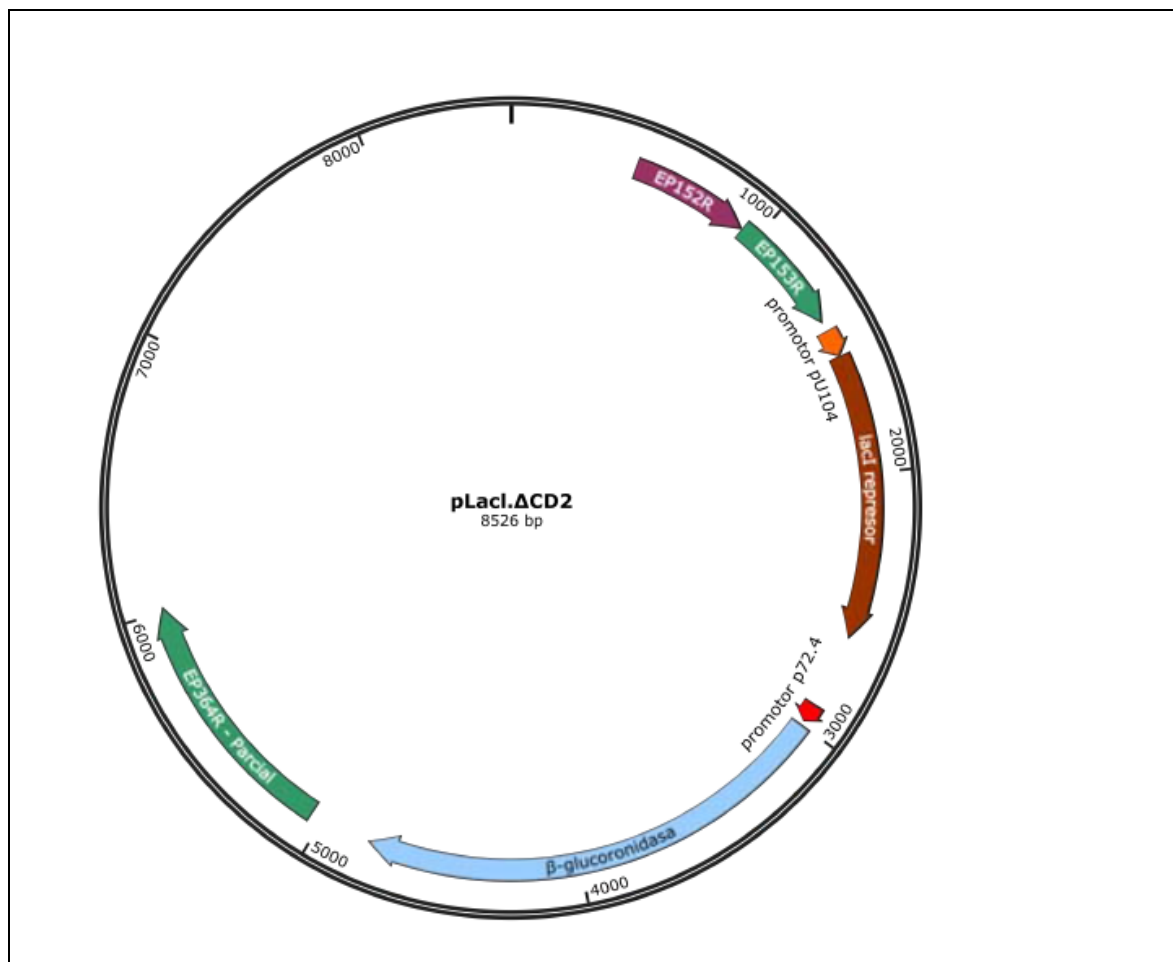
SÍ  NO

En caso afirmativo:

a. Tipo e identidad del vector (plásmido, virus, otros):

Plásmido pLacI $\Delta$ CD2.

- i) Aportar mapa de restricción del vector. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación y cualquier otro elemento presente en el vector.



ii) Si se trata de virus:

- Es defectivo en replicación                      SÍ                         NO
- Indicar cómo se obtiene el vector viral. Si se utilizan plásmidos para su obtención aportar mapa de restricción del/los plásmidos. Indicar las funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes.

b. Gama de hospedadores del vector:

Sólo para transformación en *E.coli* y recombinación con VPPA.

c. Características de la movilidad del vector:

i) factores de movilización

No aplica.

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

No aplica.

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



No.

5. Información de la secuencia insertada, delecionada o modificada.

a. Función específica de cada parte de la secuencia insertada, delecionada o modificada:

La función de la proteína de *E. coli* es el metabolismo de los carbohidratos, en el OMG actúa como gen “reporter”.

b. Información sobre los genes estructurales:

No aplica.

c. Información sobre los elementos reguladores:

Promotor vírico p72 controlando la expresión del gen “reporter”.

d. ¿Ha sido secuenciada?

SÍ.

gusA gene sequence:

```
ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCT
GTGGGCATTCAGTCTGGATCGCGAAAACCTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGG
AAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTTAACGA
TCAGTTCGCCGATGCAGATATTCGTAATTATGTGGGCAACGTCTGGTATCAGC
GCGAAGTCTTTATACCGAAAGGTTGGGCAGGCCAGCGTATCGTGCTGCGTTTC
GATGCGGTCACTCATTACGGCAAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTGATGG
AGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGTATGTTATT
GCCGGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAAGTGAAGTGGC
AGACTATCCCGCCGGGAATGGTGATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAAGCA
GTCTTACTTCCATGATTTCTTTAACTACGCCGGGATCCATCGCAGCGTAATGCT
CTACACCACGCCGAACACCTGGGTGGACGATATCACCGTGGTGACGCATGTCG
CGAAGCCTGTAACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAATGGTGAT
GTCAGCGTTGAACTGCGTGATGCGGATCAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAG
GCACCAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCACCTCTGGCAATCGGGTGA
AGGTTATCTCTATGAACTGTGCGTCACAGCCAAAAGCCAGACAGAGTGTGATA
TCTACCCGCTGCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAGTTC
CTGATCAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGCCGTCATGAAGATGC
GGATTTGCGCGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGATCACGCAT
TAATGGACTGGATTGGGGCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCTTACGCT
GAAGAGATGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATTGATGAAA
CTGCAGCTGTCGGCTTTAACCTCTCTTTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGCAAC
AAGCCGAAAGAAGTGTACAGCGAAGAGGCAGTCAACGGGGAAACTCAGCAG
GCGCACTTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAAACCACCCAA
GCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCCGTCCGCAAGGTGC
ACGGGAATATTTGCGGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCCGACG
CGTCCGATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCAT
CAGCGATCTCTTTGATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCA
AAGCGGCGATTTGGAAACGGCAGAGAAGGTACTGGAAAAAGAACTTCTGGCC
TGGCAGGAGAAACTGCATCAGCCGATTATCATCACCGAATACGGCGTGGATA
```



```
CGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATGTGGAGTGAAGAGTATCA
GTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCGCGTCAGCGCCGTCG
TCGGTGAACAGGTATGGAATTTTCGCCGATTTTTCGACCTCGCAAGGCATATTG
CGCGTTGGCGGTAACAAGAAGGGCATCTTCACCCGCGACCGCAAACCGAAGT
CGGCGGCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAA
CCGCAGCAGGGAGGCAAACAATGA
```

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

No.

- f. ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.

No.

6. Si se ha utilizado un vector, ¿cuál es su situación final en el OMG?

- a. Si el vector es un plásmido

i) Se pierde

ii) Se inserta en el genoma

- Aleatoriamente

- En un sitio definido

- o Localización cromosómica:

- o Secuencias colindantes:

- o La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

iii) Se mantiene en forma episómica

- Número de copias:

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

- b. Si el vector es un virus:

i) Se mantiene en forma episómica

ii) Se inserta en el genoma

- La inserción se produce al azar

- La inserción es específica

- o Localización cromosómica:



- Secuencias colindantes:

- La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes:

- iii)** Existe la posibilidad de formación de partículas víricas. Justificar:

- c.** Análisis moleculares previstos relativos a la expresión del producto deseado (*PCR, Southern, Northern, secuenciación, otros*):

- i)** Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)
- ii)** Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)
- iii)** Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)



V. **INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (OMG)**

1. Descripción del OMG final

Una cepa del VPPA atenuada mediante delección del CD2v, codificado por el gen EP402R.

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 ser humano, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar:

Sí. A las dosis ensayadas, no produce la enfermedad en cerdo.

- d. ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:

No.

- e. ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese:

No aplica.

- f. Marcadores específicos del OMG:

Gen "reporter" gusA.

3. Información sobre la estabilidad genética previsible del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*):

Estable a largo plazo, análisis en curso.

4. Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos. Justificar:

No.

5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

- a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

PCR, secuenciación.

- b. Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:

No aplica. El OMG se usará únicamente en las instalaciones de alta seguridad biológica del IRTA-CReSA por lo que no habrá liberación en el medio ambiente.





## VI. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1. Descripción de la actividad. (Breve resumen de los ensayos que se prevén realizar, incluidos los que se llevarán a cabo con el OMG).

El OMG se manejará siempre dentro de las instalaciones de alta bioseguridad del IRTA-CReSA, en una actividad prevista entre agosto y noviembre de 2023. Tras la inoculación intranasal *in vivo* del OMG en los cerdos, se obtendrán muestras de 10 ml sangre sin anticoagulante antes y después de su inoculación, 10mL de sangre-EDTA, saliva e hisopos nasales para estudiar la respuesta inmune generada por el OMG y el adyuvante CReSHog® en el animal. Estos muestreos se harán a 0 días post-vacuna (dpv), 7dpv y 16dpv, y a días 0 post-desafío (dpc), 6dpc, 12dpc, 19dpc y 22dpc.

En las necropsias, se obtendrán diferentes tejidos de mucosa nasal, linfonodos gastrohepático, submandibular y retrofaríngeo, tonsila, GALT, pulmón y bazo.

Las muestras obtenidas se almacenarán en serotecas, tubos eppendorf o crioviales en los congeladores de las instalaciones de alta biocontención del IRTA-CReSA para su posterior procesamiento mediante las técnicas de qPCR, ELISA, Luminex, Trizol o ELISpot. Estas muestras siempre se usarán contemplando las reglas de seguridad establecidas en el laboratorio, dentro de barreras primarias, CSB (ver apartado 8 del título VII).

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

2. Información sobre el volumen o cantidad de OMG a utilizar:

- a. Volumen o concentración máxima por ensayo en el caso de microorganismos.

- i) Para preparación de lotes

No aplica.

- ii) Para Inoculaciones. Método de inoculación *in vitro/ in vivo*:

Inoculación *in vivo* intranasal, 2mL de OMG en solución salina (PBS) por animal. Dosis segura máxima de  $10^6$  PFU por animal. 48mL totales.

- b. Número aproximado de plantas por ensayo:

No aplica.

- c. Número aproximado de animales por ensayo:

24 cerdos Landrace x Large White de 6 semanas de edad, todos inoculados con el prototipo vacunal OMG.

3. Naturaleza de las operaciones:

- a. Enseñanza
- b. Investigación
- c. Desarrollo

4. 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 realizar el experimento *in vivo* con el OMG en agosto-noviembre de 2023. Teniendo en cuenta entre una y dos semanas de aclimatación de los animales y 7 semanas de estudio, la actividad tiene una duración de 8-9 semanas. Todos los experimentos se realizarán en las instalaciones de alta seguridad del CReSA una vez aprobados por los comités de experimentación animal (IRTA y Generalitat de Catalunya), el comité de Bioseguridad del IRTA y la Comisión Nacional de Bioseguridad.

## VII. EVALUACIÓN DE RIESGO

Se tendrán en cuenta los elementos y el procedimiento conforme al Anexo I del Real Decreto 178/2004 de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las notas de orientación para la evaluación de riesgo).

1. Identificar cómo pudieran afectar las posibles propiedades nocivas del organismo receptor, donante, inserto y vector al OMG que se va a generar:

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

### a. Organismo receptor.

La cepa BA71ΔCD2 del virus de la peste porcina africana (VPPA) es un prototipo vacunal experimental. A partir de la cepa parental patógena BA71 se han eliminado, mediante recombinación homóloga, la proteína CD2v codificada por el gen EP402R. Dicha delección hace que el virus sea atenuado en su huésped natural, el cerdo. Este virus se ha generado en las propias instalaciones de IRTA-CReSA.

### b. Organismo donante.

El organismo donante en el caso del OMG BA71ΔCD2 es *Escherichia coli*. Dicha bacteria forma parte de la microbiota intestinal de muchas especies animales, incluyendo la humana. *Escherichia coli* puede actuar como patógeno oportunista. La obtención del plásmido de transferencia codificando para el gen GusA (utilizado como gen reporter en el OMG resultante) se hizo por síntesis *in vitro*.

### c. Inserto.

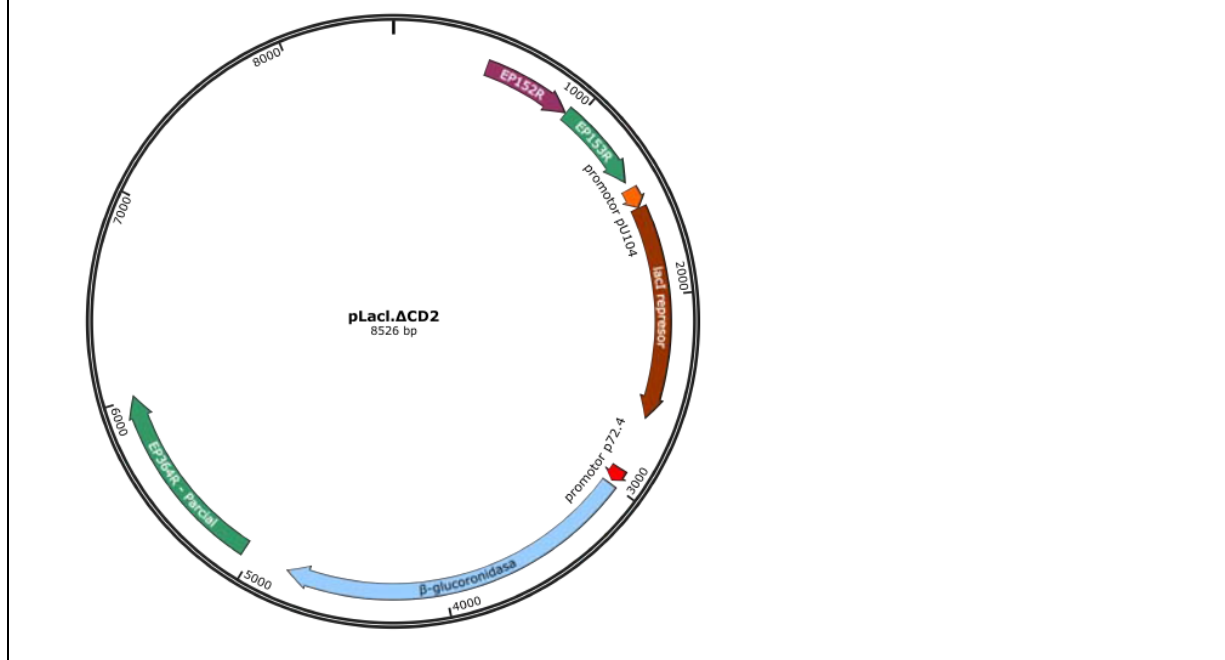
La función del inserto (gen GusA) es el metabolismo de los carbohidratos por parte del organismo donante, *E. coli*. En el GMO actúa como un gen “reporter”.

### d. Vector.

El vector de transferencia utilizado fue el plásmido pLacI. El mapa del vector original se muestra en la figura adjunta. Este vector no contiene ningún elemento regulatorio para eucariotas conocido.

El OMG resultante no muestra ningún cambio durante la replicación en cultivo celular (macrófagos alveolares porcinos, 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. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG<sup>5</sup>

### a. Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

No tiene efectos nocivos en la salud humana. 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.

Referente a la bacteria CReSHog®, usada como adyuvante, no tiene efectos nocivos ni en humanos ni en cerdos, ya que forma parte de la microbiota prevalente en el tracto respiratorio superior en ambas especies. Tampoco se esperan efectos nocivos en ningún otro organismo, ya que todos los experimentos y manipulaciones de CReSHog® junto con el prototipo vacunal se harán dentro de las instalaciones BSL3 del CReSA.

### b. Efectos para el medio ambiente.

No aplica.

## 3. Descripción de las fases críticas de los ensayos en cuanto a bioseguridad):

Todas las actividades y fases de los ensayos previstos con el OMG junto con CReSHog® se harán en las instalaciones de alta bioseguridad BSL3 del IRTA-CReSA. Las características de la actividad son un uso confinado del OMG para inoculación en animales de experimentación (cerdos), y obtención de muestras para evaluar la respuesta inmune frente al mismo y su capacidad de conferir protección frente a un aislado virulento de VPPA. El confinamiento será el típico de una unidad de

<sup>5</sup>. Si se considera que no tienen efectos adversos para la salud y el medio ambiente, también hay que justificarlo.



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.

4. Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse en las diferentes fases:

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 ESCO StreamLine CR-1545 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. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA<sup>6</sup>**

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

<sup>6</sup> En el caso de que la actividad se realice en una instalación ya autorizada, se deberán describir las medidas de protección adicionales a las descritas en el formulario B que se presentó en la solicitud para la autorización de la instalación, teniendo en cuenta el riesgo específico de la actividad.





temperatura de 150°C por un mínimo de 3 horas a 3 atmósferas de sobrepresión. Para cadáveres animales 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.

b. Gestión por una empresa externa: SÍ  NO

– Nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:

PREZERO

## X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA

1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

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

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

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

3. Descripción de la información y formación 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 y contingencia:

Hay un plan de emergencia aprobado a disposición del personal.