



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

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
------------------------	----------------------------

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: Zoetis Manufacturing & Research Spain S.L.
Dirección postal: Ctra. de Camprodon s/n, "La Riba"
17813 Vall de Bianya, Girona.

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Alicia Urniza Hostench
Cargo: Directora de I+D
Tel: 972 290 001
Fax: 972 291 336
Correo electrónico: alicia.urniza@zoetis.com

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Elisenda Viaplana Florensa
Cargo: Responsable de Laboratorio
Tel: 972 290 001
Fax: 972 291 336
Correo electrónico: elisenda.viaplana@zoetis.com

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

Nombre y apellidos: Anna Vila Quintana
Cargo: Responsable de Regulatorio
Tel: 972 290 001
Fax: 972 291 336
Correo electrónico: anna.vila@zoetis.com

e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto
El responsable de bioseguridad de la instalación actuará como persona de contacto.



2) Debe señalarse si para la ejecución de esta actividad se recibe financiación del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación. 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

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:

09 de Junio de 2010

b) Número de referencia del expediente:

A/ES/10/I-02

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

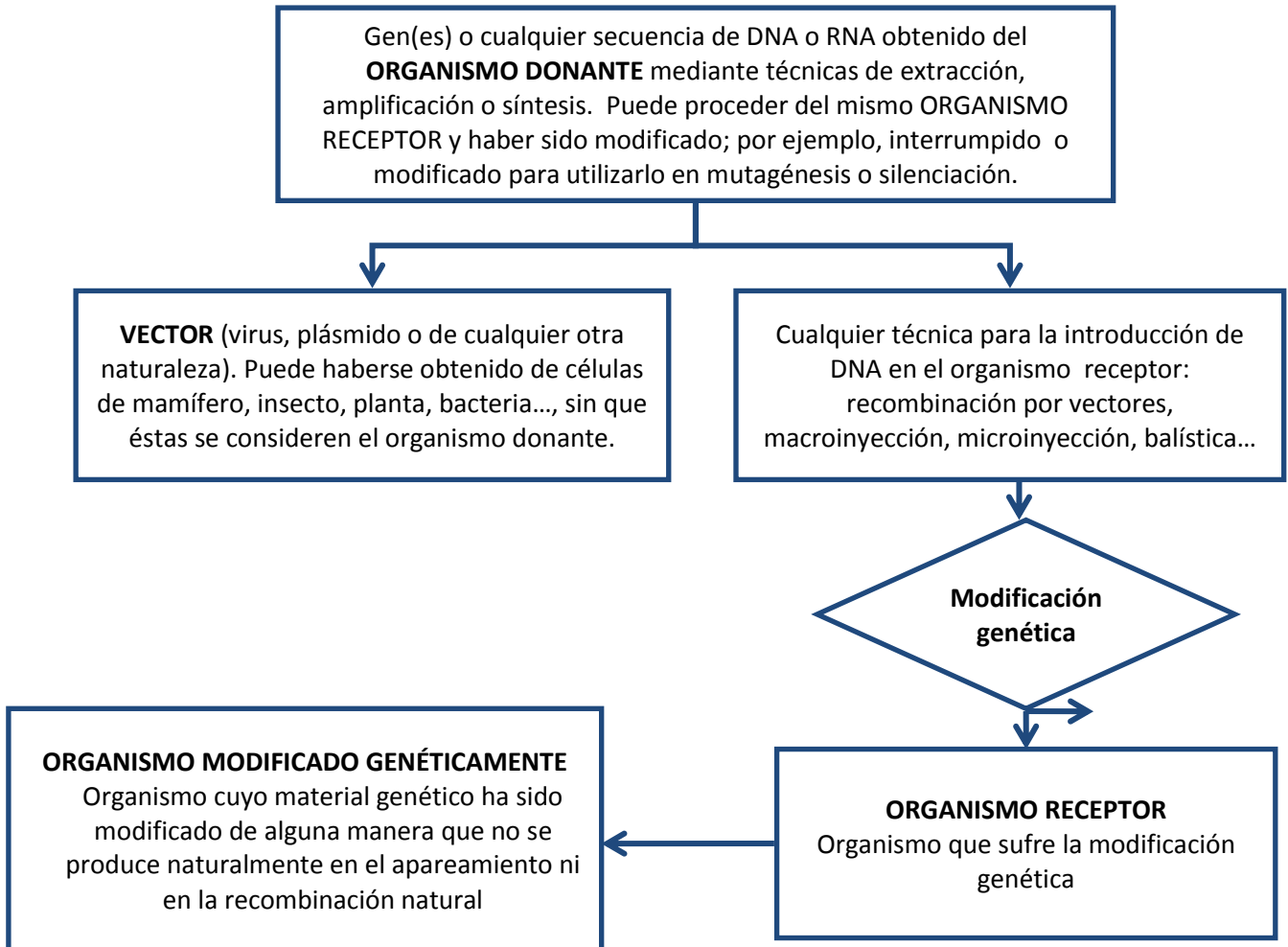
Crecimiento de un virus modificado genéticamente del Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA o ASFV del inglés *African Swine Fever Virus*).

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:
African Swine Fever Virus (ASFV)

Taxonomía:
Familia – Asfaviridae
Género - *Asfivirus*

Nombre común:
No aplica.

- 2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- a) Técnicas de aislamiento:

El organismo receptor es un ASFV proveniente de un aislado proveniente de muestras de un cerdo que presentaba signos clínicos de ASF. El virus fue amplificado en cultivos primarios y la presencia de ASFV se demostró por PCR y por ELISA. La caracterización genética de la cepa se realizó mediante el mapa de restricción y secuenciación del genoma viral.

- b) Técnicas de identificación:

Las técnicas de identificación del organismo receptor se describen en el apartado anterior e incluyen la PCR, ELISA, mapa de restricción y secuenciación del genoma del aislado.

- c) Marcadores genéticos:

El organismo receptor no contiene marcadores genéticos específicos. Se diferencia del OMG a nivel genético mediante las técnicas de identificación descritas en el apartado anterior.

- d) Marcadores fenotípicos:

No existen marcadores fenotípicos del organismo donante.

- e) Estabilidad genética:

Después de realizar pases seriados, el virus modificado genéticamente resultante tiene la estructura genómica requerida.

- 3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

No hay evidencia de posibles modificaciones anteriores.

El virus parental de ASFV se obtuvo a partir de muestras de campo provenientes de cerdos infectados. Posteriormente se realizaron pases en cultivos primarios de macrófagos alveolares de cerdo para obtener el estoc de virus que se ha utilizado en la generación del ASFV modificado genéticamente.

El ASFV parental no se ha liberado al medio ambiente y es poco probable que haya sido modificado genéticamente.

El virus se ha cultivado en el laboratorio bajo condiciones de bioseguridad de nivel 3 estrictas y controladas que minimizan el riesgo de contaminaciones cruzadas con otros virus.

- 4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI NO



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:

El organismo receptor es patógeno para cerdos domésticos y jabalíes pero en ningún caso se manipulará el virus parental.

- 5) 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.):
No aplica.

- a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

El ASFV causa fiebres hemorrágicas en cerdos domésticos y jabalíes provocando una elevada mortalidad.

La Peste Porcina Africana (PPA, ASF del inglés African Swine Fever) es una enfermedad muy contagiosa que puede afectar a los cerdos de todas las edades sin selección de sexo. Se distinguen distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad: hiperaguda, aguda, subaguda y crónica.

Los ASFV producen una serie de síndromes que varían de la forma hiperaguda, aguda a la enfermedad crónica con portadores del virus aparentemente sanos.

La enfermedad más aguda se caracteriza por una elevada fiebre, hemorragias y elevada tasa de mortalidad.

En cerdos domésticos y jabalíes europeos las manifestaciones clínicas de la enfermedad son variables, mientras que los jabalíes africanos presentan infecciones de tipo subclínico e inaparente actuando como reservorios de la enfermedad (OIE, 2009. Technical disease card of African Swine Fever; OIE, 2012, Terrestrial Manual; European Food Safety Authority (EFSA) 2010, Scientific review on African Swine Fever).

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

SI NO

Porqué:

El organismo receptor es patógeno pero en ningún caso se manipulará el virus parental.

- 6) La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?
El virus parental u organismo receptor se purificó por dilución límite y no contiene agentes biológicos contaminantes.

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

El virus parental o receptor se manipuló en instalaciones de alto nivel de biocontención (BSL3) durante largos periodos sin ningún incidente que comprometiera la bioseguridad ni el medio ambiente.

En nuestras instalaciones únicamente se manipulará el OMG y en ningún caso se manipulará el organismo parental.



8) 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?:
No

En caso afirmativo:

- b) 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 | <input type="checkbox"/> |

- c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

No aplica

- d) Posibles nichos ecológicos:

No aplica

- e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica

9) 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:

Los huéspedes de las cepas naturales de ASFV son de la especie porcina (doméstica y salvaje). La epidemiología de ASF es compleja debido a que se presentan distintos patrones de infección en África y Europa.

Los ASFV producen una serie de síndromes que varían de la forma hiperaguda, aguda a la enfermedad crónica con portadores del virus aparentemente sanos.

La enfermedad más aguda se caracteriza por una elevada fiebre, hemorragias y elevada tasa de mortalidad.

En cerdos domésticos y jabalís europeos las manifestaciones clínicas de la enfermedad son variables, mientras que los jabalís africanos presentan infecciones de tipo subclínico e inaparente actuando como reservorios de la enfermedad.

Las garrapatas del género *Ornithodoros* actúan tanto como vectores biológicos de la enfermedad como reservorios del virus (OIE, 2009. Technical disease card of African Swine Fever; OIE, 2012, Terrestrial Manual; European Food Safety Authority (EFSA) 2010, Scientific review on African Swine Fever).

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

El ASFV está presente en cerdos salvajes y cerdos domésticos en un gran número de países de África subsahariana. Se han detectado casos también en la isla de Cerdeña, países del Cáucaso y Federación Rusa. Está considerada de declaración obligatoria por la Organización mundial de Sanidad Animal (OIE).



11) Hábitat natural del organismo:

Los huéspedes de las cepas naturales de ASFV son de la especie porcina (doméstica y salvaje).

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico:

Escherichia coli

Taxonomía: Familia – Enterobacteriaceae

Género – *Escherichia*

Nombre común: *E. coli*

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

La secuencia correspondiente a un gen marcador se clonó en un plásmido de clonaje. El gen marcador se clonó corriente abajo del promotor de un gen de ASFV en el vector de transferencia. La expresión del gen marcador permitió la identificación de los virus recombinantes en los cuales se insertó el gen.

3) Método de obtención:

- a) Extracción
- b) PCR
- c) Síntesis in vitro

4) Función del gen/genes en el organismo donante

El gen en el organismo donante actúa como marcador de los virus recombinantes.

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

SI (Virus activo) NO (Virus inactivado, ADN plasmídico o RNA vírico)

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

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

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

El organismo donante utilizado fue el ADN plasmídico del vector de transferencia y no es patógeno.

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

El gen marcador codifica por una proteína que no está implicada en la patología ni en ningún efecto nocivo de la PPA.

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

2) Finalidad de la modificación genética:

El objetivo de la modificación genética es la reducción de la patogenicidad del ASFV para permitir la inducción de una respuesta inmune protectora en los cerdos frente al virus parental.

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

El virus recombinante deriva de un proceso de recombinación homóloga en el que se ha delecionado material genético del aislado de ASFV y en su lugar se ha insertado el gen marcador. Éste proceso fue posible gracias a la construcción de un vector de transferencia que replica en *E.coli* portador de un gen marcador bajo el control de un promotor de ASFV. El plásmido de transferencia se transfectó en células infectadas con el aislado ASFV y el virus recombinante se generó por recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes del plásmido de transferencia y el genoma de ASFV.

Los virus recombinantes se identificaron por la expresión del gen marcador y se aislaron utilizando células susceptibles al ASFV.

El virus puede ser propagado en macrófagos alveolares de cerdo y produce efecto citopático en cultivos celulares.

Los virus recombinantes seleccionados fueron caracterizados y se analizó el genoma mediante PCRs específicas.

La replicación del virus recombinante resultante en cultivos celulares de macrófagos alveolares de cerdo demostró que la modificación no afectaba la capacidad replicativa del OMG.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector:
Plásmido de transferencia.

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):
Información confidencial.



- d) Gama de hospedadores del vector:
Bacterias *E.coli*
- e) Características de la movilidad del vector:
- i) Factores de movilización
No aplica.
 - ii) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?
No aplica.
 - iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?
No.
- 5) Información del inserto:
- a) Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia:
Información confidencial.
 - b) Origen y función específica de cada parte del inserto:
Información confidencial
 - c) Descripción del método utilizado para la transformación:
El plásmido de transferencia se transformó en células competentes de *E.coli* mediante procedimientos estándar. Las colonias transformadas se seleccionaron por su crecimiento en medio de cultivo suplementado con antibiótico.
 - d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:
No aplica.
 - e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:
El único elemento regulador incluido en el inserto son los nucleótidos del promotor del gen de ASFV. Éste promotor es específico para la RNA polimerasa de ASFV pero no es reconocido por la RNA polimerasa del huésped.
 - f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?
No.
 - 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.
Las secuencias flanqueantes del genoma de ASFV codifican para secuencias con función desconocida.



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 aplica

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):

i) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

ii) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

iii) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto.

Durante el proceso de obtención del OMG se realizaron diferentes ensayos con el fin de verificar la construcción y caracterizar el virus recombinante resultante.

Para diferenciar los virus recombinantes del parental se seleccionaron los virus mediante la detección por PCR y por secuenciación.

Los marcadores fenotípicos incluyeron la expresión del gen marcador.

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:
Se espera la atenuación completa del OMG
 - 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
 - f) Marcadores específicos del OMG:
PCR específicas pueden ser usadas para demostrar la pureza del OMG. La expresión del gen marcador permite discriminar entre el OMG y las cepas salvajes de ASFV.
- 3) Estabilidad genética del OMG (Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones)
La estabilidad genética del inserto es alta ya que no se han detectado cambios en la expresión del gen marcador después de múltiples pases del OMG en cultivos.
- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos:
La transferencia de material genético a otros organismos únicamente es posible si las células son co-infectadas con algún otro aislado de ASFV.
- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.
- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.
El virus ASFV recombinante se identificó e mediante la detección de la expresión del gen marcador.
El virus recombinante se aisló en cultivos celulares.

Una PCR específica se puede utilizar para identificar el OMG genéticamente. Además, se pueden utilizar anticuerpos específicos para identificar la proteína expresada en cultivo celular.
 - b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente.
No aplica

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: 2L
- b) Número de plantas:
- c) Número de animales:

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada

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

Se prevé un período de cinco años.

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

Crecimiento del OMG de ASFV.

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:

El OMG se generó en un centro de investigación que dispone de instalaciones de elevado nivel de biocontención para la investigación con virus animales. Los niveles de biocontención están regulados por una guía que define los requerimientos de control y biocontención para prevenir la liberación al medio ambiente de patógenos animales que puedan causar enfermedades en humanos y animales.

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 aplicable¹ (tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

El OMG es un ASFV clasificado con nivel 3 de confinamiento BSL3 no se generará en las instalaciones de Zoetis Manufacturing & Research Spain, S.L.

Se recibirá un stock de virus que se transportará siguiendo la reglamentación internacional relativa al transporte de sustancias infecciosas. Concretamente, el embalaje constará de tres contenedores, el primero de los cuales será a prueba de derrames. El segundo y tercer contenedores se embalarán conforme con los requerimientos de la ADR y la IATA para envíos de sustancias infecciosas que afectan a animales de clase 6.2, Categoría A. Estas medidas aseguran el cumplimiento de las normativas de transporte terrestre y aéreo para este tipo de patógeno.

Entre el primer y segundo contenedor, habrá suficiente material absorbente para absorber la sustancia infecciosa en el improbable caso que haya un vertido del primer contenedor.

¹ Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- 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. El formulario necesario para acompañar a los OMG en el transporte, puede encontrarse en el siguiente enlace: (<http://www.biodiv.org/biosafety/cop-mop/result.aspx?id=8288&lg=1>)
- Normativa nacional e internacional (OACI/IATA, OMI/MDG, TPF/RID y TPD/ADR) para el transporte de mercancías peligrosas y, en particular, de sustancias infecciosas y muestras para diagnóstico.



El contenedor terciario cumplirá los estándares UN de envíos. Esto significa que está testado para resistir caídas y reventones durante el transporte.

El transporte va a ser realizado a través de un Courier especializado que asegure un transporte seguro y que la calidad del material biológico se mantiene.

- 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 crecimiento del OMG de ASFV se llevará a cabo mediante técnicas de cultivos celulares.

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

Los estudios de crecimiento del virus recombinante se llevarán a cabo en laboratorios de bioseguridad de nivel 3 (BSL 3) de acceso restringido mediante procedimientos establecidos de flujo de material, vestimenta y personal específicos del laboratorio.

Todo trabajo relacionado con el virus se hará en cabinas de bioseguridad de clase 2, utilizando técnicas asépticas para reducir el riesgo de infección. Los cultivos se harán en recipientes estancos.

Todos los residuos generados durante los estudios se descontaminarán en las instalaciones del Laboratorio BSL 3.

Los residuos líquidos y sólidos generados en el laboratorio se descontaminan con ciclos validados de descontaminación en autoclave siguiendo procedimientos normalizados de trabajo establecidos.

Las distintas áreas del laboratorio BSL 3 se descontaminarán mediante un sistema validado de descontaminación que garantiza la biocontención, previene la fuga de microorganismos al exterior y evita posibles contaminaciones cruzadas.

Los efluentes generados en el laboratorio BSL 3 procedentes de los laboratorios, desagües, servicios, duchas, etc... se tratarán y descontaminarán con el fin de evitar cualquier riesgo para la salud personal y para el medio ambiente.

Bibliografía:

- European Food Safety Authority (EFSA) 2010, Scientific review on African Swine Fever
- OIE 2009. Technical disease card of African Swine Fever.
- OIE, 2012 Terrestrial Manual.

VIII.- INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

El riesgo de contaminación en dependencias cercanas a la instalación o en el medio ambiente externo a Zoetis Manufacturing&Research Spain S.L. es prácticamente inexistente por las siguientes razones:

El laboratorio está equipado con todos los medios e infraestructura de contención necesaria, resaltándose el sistema de tratamiento de aire con gradientes de presión negativa, la presencia de filtros absolutos HEPA para la entrada y la salida de aire, el sistema de



descontaminación del laboratorio BSL-3, los sistemas de descontaminación de líquidos y sólidos por autoclave y el sistema de inactivación biológica de efluentes líquidos.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

El clima es mediterráneo de montaña media. Las precipitaciones son abundantes durante todo el año, siendo el invierno la estación más seca. Las frecuentes lluvias generan unos veranos frescos, mientras que la influencia del Pirineo hace que los inviernos sean fríos.

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:

Las operaciones indicadas se realizarán en el laboratorio de nivel de confinamiento 3 del Departamento de Investigación y Desarrollo de Zoetis Manufacturing&Research Spain S.L.

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

El laboratorio BL2 de I+D de Zoetis Manufacturing & Research Spain, S.L. está inscrito con el número BPL049CAT en el Programa de verificación del cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio establecido por la Dirección General de Ordenación y Regulación Sanitarias de la Generalitat de Cataluña y fue certificado por primera vez por el Departamento de Agricultura, Ganadería, Pesca, Alimentación y Medio Natural el 25 de Marzo de 2011.

El centro cumple los principios de BPL, establecidos en el Real decreto 822/1993.

El laboratorio está sometido a inspecciones periódicas por parte de la Subdirección General de Farmacia y Productos Sanitarios, organismo encargado de la aplicación de estos principios en el campo de medicamentos y productos sanitarios y cosméticos en Cataluña, de acuerdo con el Real Decreto 2043/1994. La última inspección del laboratorio se realizó en Abril del 2015.

La metodología de trabajo de los principios BPL se cumple en la realización de los estudios realizados en todas las instalaciones del departamento de I+D (instalaciones BL2 y BL3).

2) Formación del personal adscrito:

Todo el personal está cualificado para el puesto de trabajo que desempeña y sigue programas de formación periódicos.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Se dispone de procedimientos normalizados de trabajo para la limpieza/desinfección/descontaminación de equipos e instalaciones.

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:



Existe un programa preventivo del Departamento de Investigación y Desarrollo llevado a cabo por técnicos especialistas que garantiza el buen mantenimiento y funcionamiento de las instalaciones.

Anualmente en el laboratorio BSL 3 se realizan cualificaciones y/o calibraciones de las cabinas de bioseguridad, autoclave, sistema de descontaminación, calibración de sondas de pH, presión y temperatura y cualificación de la integridad de filtros. Periódicamente se realizan mantenimientos preventivos de las unidades de HVAC (*Heating, Ventilating and Air Conditioning*). Los mantenimientos preventivos y las calibraciones de los equipos están gestionados a través de una plataforma de trabajo.

X.- GESTIÓN E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1) Encargado de la gestión de residuos:

Gestión interna:	SÍ	<input checked="" type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>
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:
CONSENUUR

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

Zoetis Manufacturing & Research Spain, S.L. tiene contratada una empresa externa para la gestión de residuos generados en la planta.

Los restos de material desechable utilizado en el laboratorio considerado como residuos sanitarios de la planta se depositan en contenedores especiales para residuos de la empresa. Los residuos y el material contaminado son tratados en el mismo laboratorio por métodos químicos o térmicos (autoclave) antes de entregarlos a una empresa gestora externa que procede a su eliminación. Esta empresa está autorizada por la Agencia de Residuos de la Generalitat de Catalunya.

Gestión de fluidos:

Todo el material del laboratorio se inactiva en autoclave dentro del laboratorio BSL3.

Las aguas residuales procedentes del laboratorio BSL3 son recogidas e inactivadas por un sistema de descontaminación previo a su paso por las instalaciones de descontaminación de efluentes de la Planta.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Posibles accidentes que podrían ocurrir en el laboratorio durante la manipulación de estos organismos biológicos serían roturas y derramamientos, inoculaciones accidentales, cortes y abrasiones; ingestión accidental de sustancias potencialmente peligrosas; formación de aerosoles potencialmente peligrosos; rotura de tubos de centrifugas etc.



Todas estas situaciones y cómo se debe de actuar en caso de producirse, están descritas en procedimientos normalizados de trabajo para evitar cualquier posibilidad de contaminación tanto de personal como del medio ambiente.

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Para la manipulación de agentes biológicos es obligatorio que el personal lleve ropa de laboratorio, cofia, calzado de seguridad, guantes de nitrilo, gafas de seguridad y máscara de protección.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Se dispone de Procedimientos de seguridad sobre la manipulación de organismos biológicos y de planes y medidas de emergencia que recogen estas situaciones y cómo debe de actuarse en caso de producirse un accidente o situación de riesgo.

4) Planes de emergencia:

Zoetis Manufacturing&Research Spain S.L. dispone de un Plan General de Emergencia para toda la planta. Este plan de emergencia se actualiza periódicamente para mejorar la capacidad de respuesta e introducir pequeños cambios necesarios. A su vez, también se realizan simulacros de emergencia para familiarizar al personal ante potenciales situaciones de emergencia y formar al personal sobre qué actuaciones deben de realizarse.

El Departamento de Investigación y Desarrollo se encuentra ubicado en un edificio aislado. A través de la norma de seguridad se establecen las pautas de actuación en caso de producirse un incendio en el edificio de investigación.



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

Nº de Registro:	Nº de Notificación:
-----------------	---------------------

Cumplimentar un formulario tipo C por cada actividad tipo 2, 3 o 4. En caso de actividades tipo 1, deben seguirse las instrucciones recogidas en el apartado III.1.a de la Guía para la remisión de solicitudes de registro de instalaciones.

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

1) Entidad

Nombre: Zoetis Manufacturing & Research Spain S.L.
Dirección postal: Ctra. de Camprodon s/n, "La Riba"
17813 Vall de Bianya, Girona.

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Alicia Urniza Hostench

Cargo: Directora de I+D
Tel: 972 290 001
Fax: 972 291 336
Correo electrónico: alicia.urniza@zoetis.com

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Elisenda Viaplana Florensa

Cargo: Responsable de Laboratorio
Tel: 972 290 001
Fax: 972 291 336
Correo electrónico: elisenda.viaplana@zoetis.com

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

Nombre y apellidos: Anna Vila Quintana

Cargo: Responsable de Regulatorio
Tel: 972 290 001
Fax: 972 291 336
Correo electrónico: anna.vila@zoetis.com



5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto

La persona responsable de la bioseguridad de la instalación.

II. **DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.**

1. Objetivo de la actividad:

Crecimiento del virus recombinante del Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA o ASFV del inglés *African Swine Fever Virus*).

2. Duración prevista de la actividad:

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

Se prevé un período de cinco años.

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.

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

Los huéspedes de las cepas naturales de ASFV son de la especie porcina (doméstica y salvaje). La epidemiología de ASF es compleja debido a que se presentan distintos patrones de infección en África y Europa.

Los ASFV producen una serie de síndromes que varían de la forma hiperaguda, aguda a la enfermedad crónica con portadores del virus aparentemente sanos.

La enfermedad más aguda se caracteriza por una elevada fiebre, hemorragias y elevada tasa de mortalidad.

En cerdos domésticos y jabalís europeos las manifestaciones clínicas de la enfermedad son variables, mientras que los jabalís africanos presentan infecciones de tipo subclínico e inaparente actuando como reservorios de la enfermedad.

Las garrapatas del género *Ornithodoros* actúan tanto como vectores biológicos de la enfermedad como reservorios del virus (OIE, 2009. Technical disease card of African Swine Fever; OIE, 2012, Terrestrial Manual; European Food Safety Authority (EFSA) 2010, Scientific review on African Swine Fever).

El organismo receptor es un ASFV proveniente de un aislado proveniente de un cerdo que presentaba signos clínicos de ASF. La caracterización genética de la cepa se realizó mediante el mapa de restricción y secuenciación del genoma viral.



La obtención del OMG se realizó por un proceso recombinación homóloga en el que se delecionó material genético del aislado de ASFV y en su lugar se insertó un gen marcador. En ningún caso se manipulará el virus salvaje.

b) Organismo donante.

Escherichia coli

Taxonomía: Familia – Enterobacteriaceae

Género – *Escherichia*

Nombre común: *E. coli*

c) Inserto.

El inserto del vector de transferencia consta de un cassette que contiene el gen marcador de *E.coli* bajo el control del promotor de un gen de ASFV.

d) Vector.

El organismo donante utilizado fue el ADN plasmídico del vector de transferencia y no es patógeno.

e) Organismo modificado genéticamente resultante.

El OMG de ASFV deriva de un proceso de recombinación homóloga en el que se ha delecionado una región definida de material genético del aislado de ASFV y en su lugar se insertó un gen marcador. El OMG resultante se identifica por la expresión del gen marcador. El rescate del virus recombinante, crecimiento y clonaje del OMG se llevó a cabo en cultivos celulares.

Los virus recombinantes seleccionados fueron caracterizados y se analizó el genoma mediante PCRs específicas.

La replicación del OMG resultante en cultivos celulares demostró que la modificación no afectaba la capacidad replicativa en macrófagos del OMG.

f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

Los huéspedes de las cepas naturales de ASFV son de la especie porcina (doméstica y salvaje).

g) Efectos para el medio ambiente.

Se considera que el efecto para el medio ambiente es nulo.

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).

El riesgo de infección por el OMG de ASFV para humanos en las proximidades de la instalación donde se lleve a cabo el estudio es nulo ya que en humanos no se ha descrito ningún caso de infección incluso en zonas dónde la enfermedad es endémica. La vía directa de infección de la enfermedad es por contacto directo de animales infectados con animales sanos. Las vías de transmisión indirectas en cerdos incluyen la ingestión de material infectado y los vectores biológicos.

Para evitar posibles contaminaciones al medio ambiente por parte del personal de laboratorio, todo el trabajo que se efectúe con el OMG se realizará en cabinas de bioseguridad clase 2, utilizando técnicas asépticas a fin de reducir los riesgos de infección. El personal formado para realizar trabajos con OMGs, deberá tener la capacitación requerida que le cualifica para trabajar con el OMG (bajo supervisión apropiada).

Todo uso del OMG de ASFV se llevará a cabo en instalaciones con nivel 3 de biocontención (BSL-3).

Para asegurar la biocontención el laboratorio BSL-3 consta de medidas de bioseguridad estructurales, de funcionamiento y de procedimientos específicos de flujo de personal y material para toda la instalación.

El laboratorio BSL-3 tiene un control de acceso restringido únicamente al personal cualificado. Para entrar en la instalación BSL-3 se seguirán los flujos de material, vestimenta y personal establecidos específicos del laboratorio.

Para asegurar la biocontención, el sistema de climatización genera un gradiente de presión negativa que garantiza el confinamiento del GMO en el área de trabajo e impide el flujo de aire entre el área de trabajo y el medio ambiente. Las climatizadoras filtran el aire a la entrada y a la salida de las distintas salas a través de filtros absolutos HEPA.

El laboratorio dispone de un sistema validado de descontaminación que asegura la descontaminación de las áreas del laboratorio.

El laboratorio consta de un sistema de descontaminación de efluentes validado que garantiza el tratamiento de los efluentes generados en el laboratorio BSL-3.

El laboratorio BSL-3 está regulado por un sistema de gestión que monitoriza y controla el estado de las climatizadoras y todos los parámetros implicados en la gestión del BSL-3.

La manipulación del OMG se realizará siempre dentro de cabinas de seguridad biológica en receptáculos a prueba de fuga. Todos los residuos generados en el laboratorio BSL-3 (líquidos y sólidos) se inactivan en la misma instalación BSL-3 .



b) Concentración y escala utilizadas.

Escala experimental.

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).

El OMG se cultivará en frascos de plástico aptos para el cultivo celular. El sistema es confinado.

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

Las instalaciones cumplen con los requisitos de nivel de contención 3. Es por este motivo que se considera adecuado manipular este organismo en nuestras dependencias.

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 edificio del laboratorio BSL-3 de I+D se encuentra ubicado dentro del recinto de la fábrica de Zoetis Manufacturing&Research Spain S.L.. El sistema informatizado de control de accesos de personal así como el personal de vigilancia existente las 24h del día garantiza la entrada única y exclusivamente de personal de la planta autorizado. El perímetro de la fábrica se encuentra vallado.

La zona alrededor del laboratorio está clasificada como suelo rústico. Existen casas aisladas y el núcleo urbano de Hostalnou se encuentra a una distancia de 180 m.

Las granjas más cercanas al edificio se encuentran a 520 m.

b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

Para producirse un accidente grave que sobrepasara el control de Zoetis Manufacturing&Research Spain S.L. debería de producirse un incendio importante que eliminara las condiciones de biocontención que tiene el edificio.

c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales.

La empresa dispone de personal de vigilancia entrenado, las 24h del día, para supervisar todas las instalaciones y minimizar así cualquier posible accidente y sus consecuencias.

Así mismo el laboratorio está protegido en su mayoría por detección de humo y rociadores automáticos para minimizar el daño en caso de producirse un incendio. Este sistema de alarmas está conectado al sistema de gestión del edificio y a la central de alarmas.



En caso de incendio, el agua generada por los rociadores automáticos se recolecta, trata e inactiva por el sistema de descontaminación de efluentes del laboratorio BSL-3.

El laboratorio BSL-3 está regulado por un sistema de gestión que monitoriza y controla el estado de las climatizadoras y todos los parámetros implicados en la gestión del BSL-3 (presiones, circuitos de desinfección, descontaminación, etc...).

El laboratorio dispone de cabinas de bioseguridad donde se realizan todas las operaciones con OMG. A su vez, la zona de laboratorio se encuentra en depresión respecto al exterior para evitar cualquier posibilidad de contaminación del medio ambiente.

d) Planes de emergencia (para actividades tipo 3 y 4).

El edificio del laboratorio BSL-3 dispone de un procedimiento estandarizado en el que se describe el Plan de actuación contra incendios.

Referencias bibliográficas:

- OIE 2009. Technical disease card of African Swine Fever.
- OIE, 2012 Terrestrial Manual.
- European Food Safety Authority (EFSA) 2010, Scientific review on African Swine Fever