



**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-INIA/CSIC); Centro Nacional Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC); Ministerio de Ciencia e Innovación**

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

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: **Esther Esteban Rodrigo**

NIF: **05271582M**

Cargo: **Directora del INIA**

Tel:

Fax:

Correo electrónico: **esther.esteban@inia.es**

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: **Aitor Nogales González / Francisco Javier Ortego Alonso**

NIF: **51986340S / 50165853R**

Cargo: **Científico Titular de OPIs / Científico Titular de OPIs**

Tel: **91 6202300**

Fax: **91 6202247**

Correo electrónico: nogales.aitor@inia.csic.es / ortego@inia.csic.es

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

Nombre y apellidos: **Laura Pérez Palancar**

NIF: **53043241C**

Cargo: **Jefe de Área de Animalario y Seguridad Biológica**

Tel: **91 6202300**

Fax: **91 6202247**

Correo electrónico: **laura.palancar@csic.es**

e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: **Laura Pérez Palancar**



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

SI NO

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

- Nombre de la convocatoria: **Convocatoria 2020 Proyectos de I+D+i - RTI Tipo RTA**
- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: **PID2020-112992RR-I00. IP: Francisco Javier Ortego Alonso / Aitor Nogales González.**
- Organismo financiador: **Ministerio de Ciencia e Innovación.**

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: **notificación A/ES/00/I-01**

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Finalidad de la actividad:

Desarrollo de ensayos para la detección rápida, eficiente y a gran escala de anticuerpos neutralizantes y/o antivirales frente al virus de la lengua azul (Bluetongue virus: BTV). Los objetivos interrelacionados de la actividad son: 1) generar sistemas de genética reversa basados en plásmidos, para los serotipos de BTV circulantes en España (BTV-1, -4, y 8). 2) Generar virus BTV recombinantes que expresen diferentes genes reporteros, tales como proteínas fluorescentes o bioluminiscentes, como una herramienta biotecnológica que facilitará la evaluación, monitorización y cuantificación de la infección por BTV, sin necesidad de usar otros ensayos secundarios más lentos y costosos. Estos virus reporteros servirán por ejemplo para evaluar la eficiencia de vacunas o la prevalencia del virus en un determinado área.

Se realizarán estudios en cultivos celulares susceptibles a la infección por BTV para evaluar la replicación del virus y en su caso la expresión de los genes reporteros. Para ello se usarán líneas celulares establecidas de mamíferos o insectos.

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.



Además, se realizarán estudios para evaluar/comparar la patogenicidad de los virus recombinantes generados y los aislados naturales. Dichos estudios se llevarán a cabo en uno modelo de ratón susceptible a la infección por BTV, que mimetiza la enfermedad severa observada en ovejas, huésped natural del virus. Estos ratones susceptibles, Knockout IFN α / β R $^{-/-}$ (A129), están modificados genéticamente para no expresar el gen que codifica el receptor de interferón tipo I IFNAR $(-/-)$ y proceden de laboratorios MARSHALL BIORESOURCES (<https://www.marshallbio.com/mice>). Posteriormente se analizará la patogenicidad en ovejas, el hospedador natural de BTV.

Todos los ensayos (in vitro e in vivo) se realizarán en la instalación de tipo 3 del CISA-INIA-CSIC (notificación A/ES/00/I-01), del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC) autorizada con anterioridad por el Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente (CIOMG) mediante resolución con fecha 04/12/2001.

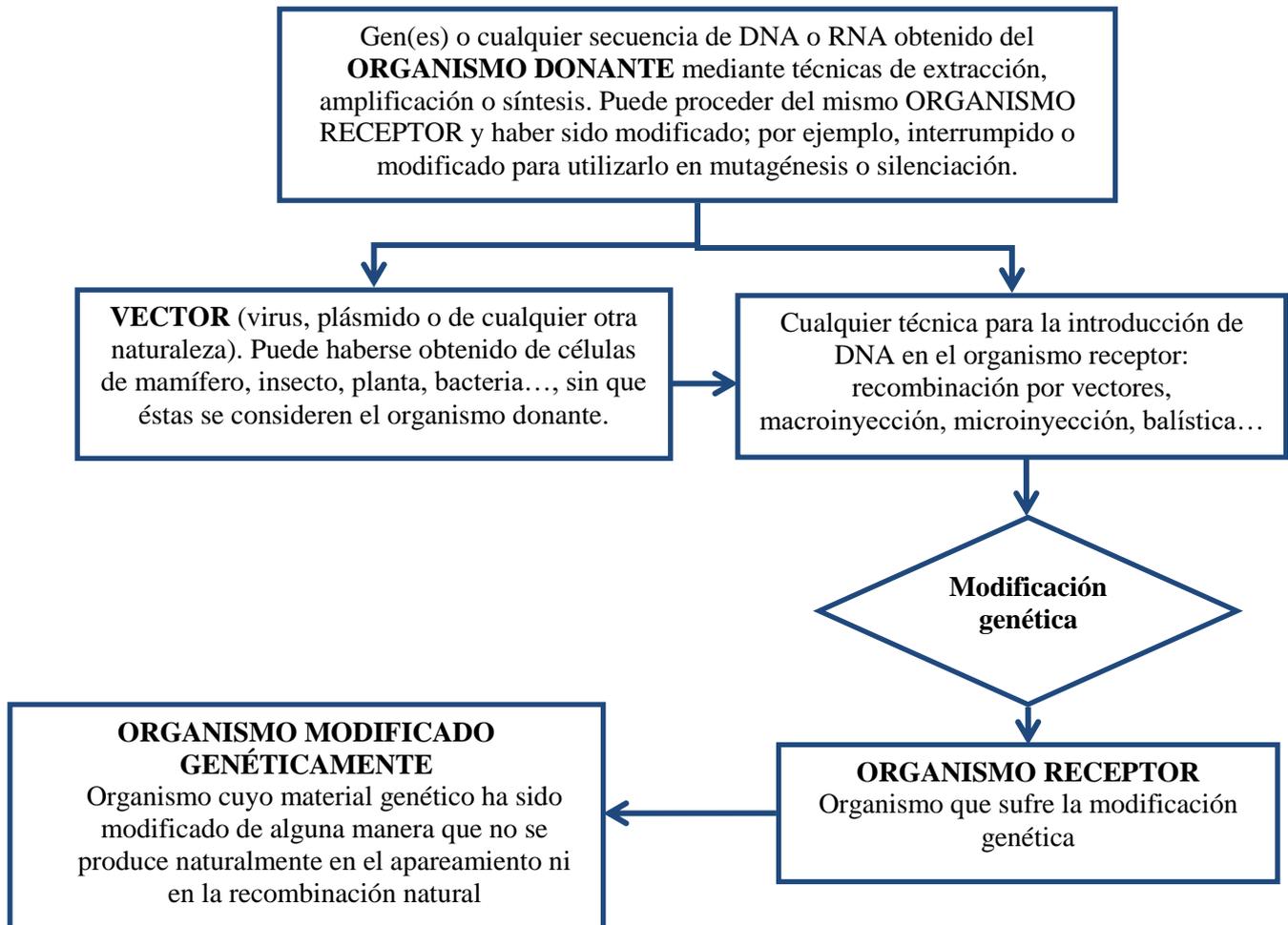
2) Clasificación de la actividad:

(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: **El organismo receptor son virus BTV de los serotipos 1, 4, 8.**

Taxonomía: Orden: Reovirales. **Familia: Sedoreoviridae. Género: Orbivirus.**

Nombre común: **Virus de la lengua azul o Bluetongue virus (BTV).**

Los nuevos virus recombinantes de BTV (rBTV) serán generados mediante técnicas de genética reversa, ya establecidas en el campo. En concreto serán generados 3 virus recombinantes: rBTV-1, rBTV-4 y rBTV-8 y los correspondientes virus expresando genes reporteros (proteínas fluorescentes mCherry o Venus o la luciferasa NanoLuc), como se detalla más adelante (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los virus recombinantes que serán generados y características genotípicas.

Virus recombinante	Segmento 2 (VP2)	Segmento 6 (VP5)	Segmento 5 (NS1)	Segmentos 1, 3, 4, 7, 8, 9 y 10.
rBTV-1	BTV-1	BTV-1	NS1 silvestre	BTV-1
rBTV-1/mCherry	BTV-1	BTV-1	NS1-2A	BTV-1
rBTV-1/Venus	BTV-1	BTV-1	NS1-2A	BTV-1
rBTV-1/Nluc	BTV-1	BTV-1	NS1-2A	BTV-1
rBTV-4	BTV-4	BTV-4	NS1 silvestre	BTV-1
rBTV-4/mCherry	BTV-4	BTV-4	NS1-2A	BTV-1
rBTV-4/Venus	BTV-4	BTV-4	NS1-2A	BTV-1
rBTV-4/Nluc	BTV-4	BTV-4	NS1-2A	BTV-1
rBTV-8	BTV-8	BTV-8	NS1 silvestre	BTV-1
rBTV-8/mCherry	BTV-8	BTV-8	NS1-2A	BTV-1
rBTV-8/Venus	BTV-8	BTV-8	NS1-2A	BTV-1
rBTV-8/Nluc	BTV-8	BTV-8	NS1-2A	BTV-1

* Todos los virus recombinantes generados tendrán una mutación silenciosa en el segmento 8 para distinguirlos de aislados naturales.



Las técnicas de genética reversa, son detalladas en las correspondientes secciones y se basan en metodologías ya descritas y establecidas en el campo. Estas técnicas se han utilizado para el rescate de virus recombinantes que permitan el estudio de las infecciones por BTV, la generación de vacunas vivas, etc. Se incluyen algunas referencias relevantes:

van Rijn PA, van de Water SG, Feenstra F, van Gennip RG. Requirements and comparative analysis of reverse genetics for bluetongue virus (BTV) and African horse sickness virus (AHSV). *Virology*. 2016 Jul 2;13:119. doi:10.1186/s12985-016-0574-7. PMID: 27368544; PMCID: PMC4930614.

Feenstra F, van Gennip RGP, Maris-Veldhuis M, Verheij E, van Rijn PA. Bluetongue virus without NS3/NS3a expression is not virulent and protects against virulent bluetongue virus challenge. *J Gen Virol*. 2014 Sep;95(Pt9):2019-2029. doi: 10.1099/vir.0.065615-0. Epub 2014 Jun 9. PMID: 24914064.

van Gennip RG, van de Water SG, van Rijn PA. Bluetongue virus nonstructural protein NS3/NS3a is not essential for virus replication. *PLoS One*. 2014 Jan 20;9(1):e85788. doi: 10.1371/journal.pone.0085788. PMID: 24465709; PMCID:PMC3896414.

van Gennip RG, van de Water SG, Maris-Veldhuis M, van Rijn PA. Bluetongue viruses based on modified-live vaccine serotype 6 with exchanged outer shell proteins confer full protection in sheep against virulent BTV8. *PLoS One*. 2012;7(9):e44619. doi: 10.1371/journal.pone.0044619. Epub 2012 Sep 25. PMID: 23049753; PMCID: PMC3458051.

van Gennip RG, van de Water SG, Potgieter CA, Wright IM, Veldman D, van Rijn PA. Rescue of recent virulent and avirulent field strains of bluetongue virus by reverse genetics. *PLoS One*. 2012;7(2):e30540. doi: 10.1371/journal.pone.0030540. Epub 2012 Feb 17. PMID: 22363444; PMCID: PMC3281837.

Pretorius JM, Huismans H, Theron J. Establishment of an entirely plasmid- based reverse genetics system for Bluetongue virus. *Virology*. 2015 Dec;486:71-7. doi: 10.1016/j.virol.2015.09.004. Epub 2015 Sep 24. PMID: 26408855.

Trask SD, Boehme KW, Dermody TS, Patton JT. Comparative analysis of Reoviridae reverse genetics methods. *Methods*. 2013 Feb;59(2):199-206. doi: 10.1016/j.ymeth.2012.05.012. Epub 2012 Jun 8. PMID: 22687622; PMCID: PMC3449048.

Roy P. Highly efficient vaccines for Bluetongue virus and a related Orbivirus based on reverse genetics. *Curr Opin Virol*. 2020 Oct;44:35-41. doi:10.1016/j.coviro.2020.05.003. Epub 2020 Jun 28. PMID: 32610251.

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- a) Técnicas de aislamiento: **Los virus silvestres son generalmente aislados directamente de sangre de ovejas infectadas tras un pase en cultivos celulares (células de insecto KC). Todos los aislados naturales ya están disponibles en el laboratorio. Los genes de los aislados naturales requeridos para el trabajo, serán sintetizados de novo (Biomatik o GenScript) como se indica en las correspondientes secciones.**
- b) Técnicas de identificación: **PCR, secuenciación, western blot, microscopía de fluorescencia, cuantificación de luciferasa, cultivos celulares (efecto citopático en cultivos celulares).**
- c) Marcadores genéticos: **Las secuencias de los virus silvestres son públicas y pueden encontrarse en bases de datos como las alojadas en “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI).**



d) Marcadores fenotípicos: Los aislados naturales causan un efecto citopático en células de mamíferos (Vero o BHK), además de inducir cambios en la morfología celular como consecuencia de la infección.

e) Estabilidad genética: **El virus de la lengua azul es estable en cultivos celulares.**

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

No aplica.

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI NO

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

La lengua azul es una enfermedad causada por el virus de la lengua azul (Bluetongue: BTV) y transmitida por vectores hematófagos. La enfermedad afecta principalmente a ovejas, aunque también puede afectar a otros rumiantes salvajes y domésticos.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de la lengua azul varían considerablemente entre las distintas especies de hospedadores y las cepas virales. El serotipo no determina la virulencia ya que existen cepas altamente virulentas y otras más benignas dentro del mismo serotipo. Aunque BTV afecta a muchas especies de rumiantes, el cuadro clínico completo de la enfermedad aparece generalmente en la oveja. Los signos clínicos pueden ser fiebre alta durante algunos días así como congestión, descarga ocular y nasal, apatía, rigidez muscular y cojera. Se da un deterioro de la lana y del estado general del animal, además se produce una pérdida de peso y se reduce la producción de leche. Las lesiones típicas son edema facial, inflamación del rodete coronario (coronitis), laminitis, necrosis en músculo esquelético y cardíaco, edemas y úlceras necróticas en la mucosa oral, edema pulmonar y trombosis vascular. Además, a veces se produce cianosis de la lengua, lo que da nombre a la enfermedad de la lengua azul, pero es un signo poco común. Otro signo peculiar de la enfermedad es la aparición de hemorragias en la base de la arteria pulmonar.

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? **No aplica. El organismo no es un patógeno humano.**

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



SI NO

Por qué:

7) La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?

No aplica

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

El grupo de investigación del INIA-CISA que manipulará el OMG posee una dilatada experiencia (15-20 años) en trabajos de investigación, desarrollo y actividades científicas y técnicas utilizando el virus BTV (y otros patógenos de relevancia en sanidad animal y humana), técnicas de genética reversa o el desarrollo de herramientas biotecnológicas.

9) Información sobre la capacidad de supervivencia y de reproducción en el medio ambiente:

a) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?: **No**

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

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: **La exposición a temperaturas iguales o mayores a 37°C, baja humedad, a luz ultravioleta, o a agentes químicos reduce drásticamente la capacidad de supervivencia de BTV fuera de las condiciones de cultivo.**

d) Posibles nichos ecológicos: **No aplica**

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: **No aplica**

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:



a) Implicaciones en procesos ambientales (*p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo*): **No aplica**

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos: **No aplica**

11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor: **España y otras regiones europeas y del norte de África. Los serotipos de BTV con los que se va a trabajar, son los que circulan en España (BTV-1, BTV-4 y BTV-8).**

12) Hábitat natural del organismo: **España y otras regiones europeas y del norte de África.**

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico:

-Nombre común: **Virus de la lengua azul o Bluetongue virus (BTV)**. Taxonomía: **Orden: Reovirales. Familia: Sedoreoviridae. Género: Orbivirus.**

-Genes reporteros:

Proteína fluorescente Venus: **Venus es una proteína fluorescente derivada de *Aequorea victoria*.**

Proteína fluorescente mCherry: **mCherry es una proteína fluorescente derivada de *Discosoma sp.***

Proteína luminiscente NanoLuc: **nanoLuc es una proteína bioluminiscente derivada de *Oplophorus gracilirostris*.**

-Secuencia 2A del teschovirus porcino 1 (porcine teschovirus 1; PTV-1). Taxonomía: **Familia: Picornaviridae. Género: Teschovirus.**

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

El virus de la lengua azul o BTV tiene un genoma de doble cadena de ARN linear y segmentado. El genoma está compuesto por 10 segmentos/genes.

Genes de BTV: Se sintetizarán de novo (Biomatik o GenScript) los 10 segmentos del serotipo 1 de BTV (BTV-1) y los segmentos 2 y 6 de los serotipos 4 y 8 de BTV (BTV-4 y BTV-8, respectivamente). El segmento 2 codifica para la proteína de la cápsida VP2, la cual determina el serotipo y es la principal diana de anticuerpos neutralizantes. El segmento 6, codifica para la proteína de la cápsida VP5, que ayuda a determinar el serotipo de BTV. Ambas proteínas están implicadas en la entrada del virus a la célula, entre otras funciones, y la proteína VP2 es la que determina el serotipo del virus.

Además en el segmento 8 (que codifica para la proteína NS2) se introducirá una mutación silenciosa (cambio de 1 nucleótido que introduce un sitio de restricción) para



distinguir el virus recombinante del aislado natural. Finalmente se producirá mediante síntesis de novo un segmento 5 (NS1) recombinante y modificado de BTV que contengan la secuencia 2A de PTV-1, para posteriormente incluir los diferentes genes reporteros. La estrategia de expresar genes reporteros desde un genoma viral mediante la secuencia 2A de PTV-1 (u otros picornavirus) ha sido ampliamente utilizada para otros sistemas virales por nosotros y otros investigadores.

El genoma de BTV será sintetizado de novo por una empresa (Biomatik o GenScript), y cada gen/segmento viral será clonado en un plásmido pUC57 y flanqueado por el promotor de la polimerasa T7 en el extremo 5' o por la ribozima del virus de la hepatitis delta y el terminador de la polimerasa T7 en el extremo 3'. Con el fin de obtener las secuencias de los genes para las proteínas fluorescentes mCherry (pCAGGS-mCherry; Addgene #41583), Venus (pCAGGS-Venus; Addgene #127346), o la luciferasa NanoLuc (pNL1.1-Nluc; Promega #N1001) utilizaremos plásmidos comerciales y los genes serán extraídos mediante PCR y posteriormente clonados en el segmento 5 (NS1) recombinante y modificado de BTV que contiene la secuencia 2A (NS1-2A).

3) Método de obtención:

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

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

Segmentos 1 a 10 del genoma de BTV: Dichos segmentos/genes codifican para las diferentes proteínas virales de BTV y tienen las mismas funciones.

Tabla 1. Segmentos genómicos y proteínas codificadas por BTV.



Segmento genómico	Proteína/s (aa)	Localización	Función
1	VP1 (1302)	Interior del Core	• RNA Polimerasa RNA dependiente (RpRd).
2	VP2 (956)	Cápside externa	• Proteína estructural específica del serotipo. • Hemaglutinina. • Entrada en la célula.
3	VP3 (901)	Core	• Proteína estructural, forma el soporte para el anclaje de los trímeros VP7. • Necesaria para el ensamblaje del virión.
4	VP4 (644)	Interior del Core	• Enzimas que cataliza la adición de residuos cap a los ARNm, guaniltransferasa / metiltransferasa.
5	NS1 (552)	No estructural	• Forma túbulos en el citoplasma celular. • Función desconocida.
6	VP5 (526)	Cápside externa	• Proteína estructural. • Permeabilización celular.
7	VP7 (349)	Superficie del Core	• Proteína estructural. Posible función en la entrada.
8	NS2 (357)	Interior del Core No estructural	• Forma los cuerpos de inclusión, fosfoproteínas que une ssRNA.
9	VP6 (329) NS4 (77-79)	No estructural	• Une ARNs y ARNbc, actividad helicasa. • Posible función protectora ante degradación de ADN. • Antagonista de interferón y determinante de virulencia.
10	NS3/NS3A (229/226) NS5 (80)	No estructural	• Glicoproteína, participa en la salida del virión. • Puede participar en la modulación de la transcripción celular. • Puede tener función específica en el nucléolo.

Proteínas fluorescentes y bioluminiscentes: Si bien las funciones de la fluorescencia y bioluminiscencia no se conocen para todos los animales que producen este tipo de reacción exoenergética, generalmente la fluorescencia y bioluminiscencia se usan para advertir o evadir a los depredadores, para atraer o detectar presas y para la comunicación entre miembros de la misma especie.

Secuencia 2A de PTV-1: Es un péptido de 19 aminoácidos de longitud, que puede inducir un salto ribosómico durante la traducción de una proteína en una célula. La secuencia 2A es empleada por los picornavirus para producir diferentes proteínas/péptidos a partir de un mismo marco de lectura.

¿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?

- La lengua azul es una enfermedad causada por el virus de la lengua azul (Bluetongue: BTV) y transmitida por vectores hematófagos. La enfermedad afecta principalmente a ovejas, aunque también puede afectar a otros rumiantes salvajes y domésticos. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de la lengua azul varían considerablemente entre las distintas especies de hospedadores y las cepas virales. El serotipo no determina la virulencia ya que existen cepas altamente virulentas y otras más benignas dentro del mismo serotipo. Aunque BTV afecta a muchas especies de rumiantes, el cuadro clínico completo de la enfermedad aparece generalmente en la oveja. Los signos clínicos pueden ser fiebre alta durante algunos días así como congestión, descarga ocular y nasal, apatía, rigidez muscular y cojera. Se da un deterioro de la lana y del estado general del animal, además se produce una pérdida de peso y se reduce la producción de leche. Las lesiones típicas son edema facial, inflamación del rodete coronario (coronitis), laminitis, necrosis en músculo esquelético y cardíaco, edemas y úlceras necróticas en la mucosa oral, edema pulmonar y trombosis vascular. Además, a veces se produce cianosis de la lengua, lo que da nombre a la enfermedad de la lengua azul, pero es un signo poco común. Otro signo peculiar de la enfermedad es la aparición de hemorragias en la base de la arteria pulmonar.

- En el caso de los genes reporteros no se ha descrito un papel en patogénesis.

-PTV-1, del que solo se usará una secuencia de 19 aminoácidos, es un virus que afecta principalmente a cerdos. La infección por PTV puede ser subclínica o causar encefalomiелitis y enfermedad grave o leve. La PTV se ha asociado en algunos casos con diarrea, neumonía, pericarditis y miocarditis. No se ha descrito que la secuencia 2A utilizada sea un factor de virulencia por si solo o fuera del contexto de PTV-1

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

Los genes de BTV sintetizados y clonados en un plásmido (pUC57) tienen las mismas funciones que los genes originales.

No se han descrito los genes que codifican para proteínas fluorescentes o bioluminiscentes, o la secuencia 2A de PTV-1 por si sola, como factores de virulencia de ningún virus o agente biológico.

5) ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

No.

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA



1) Tipo de modificación genética:

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

2) Finalidad de la modificación genética:

Insertar los genes que codifican para proteínas fluorescentes (Venus, o mCherry) o luciferasas (Nanoluc luciferasa), en el genoma de BTV-1, BTV-4 y BTV-8, con la finalidad de obtener virus recombinantes que expresen genes reporteros. La expresión de dichos genes permitirá evaluar, seguir y estudiar las infecciones por BTV o diseñar ensayos para evaluar e identificar anticuerpos neutralizantes o antivirales. Los genes reporteros serán clonados en un gen/segmento 5 de BTV recombinante, al cual se le añadirá la secuencia 2A de PTV-1. Además, en el segmento 8 de BTV se sustituirá 1 nucleótido para introducir una mutación silenciosa (que introduce un sitio de restricción para XhoI) que permita distinguir el virus recombinante del aislado natural.

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

Los segmentos de BTV serán sintetizados de novo y clonados en un plásmido pUC57 por una compañía (Biomatik o Genscript). El segmento 5 recombinante conteniendo la secuencia 2A, será igualmente sintetizado de novo y clonado en un plásmido pUC57. Posteriormente los genes reporteros serán amplificados por PCR y clonados en el segmento 5 de BTV que contiene la secuencia 2A de PTV-1.

El virus modificado genéticamente se recupera por transfección de células con los 10 plásmidos que codifican cada uno de los genes/segmentos de BTV. En el caso del segmento 5, se usarán distintas alternativas utilizando plásmidos que contengan el segmento original o las versiones modificadas para expresar cada uno de los genes reporteros.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector: **Plásmido**

b) Si se trata de un virus: **No aplica**

Es defectivo en replicación SÍ NO

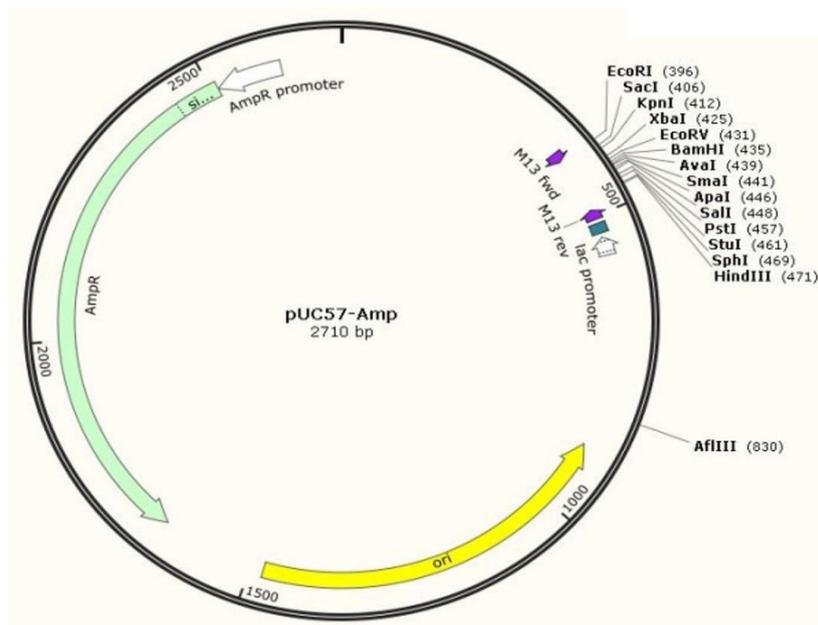
- c) Aportar mapa de restricción del vector (*funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes en el vector*):

Plásmido pUC57 para clonar los distintos genes de BTV, el cual está modificado para flanquear el segmento viral con un promotor para la polimerase T7 en el extremo 5' y la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta y un terminador de la polimerasa T7 en el extremo 3'. Como se indica:



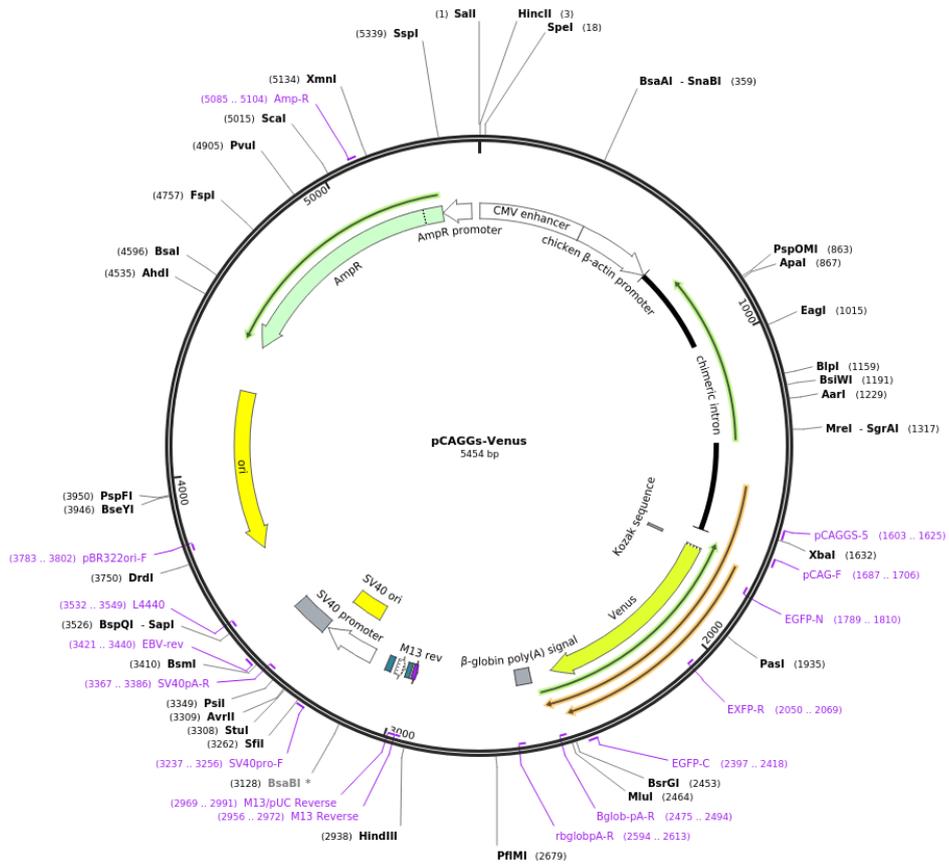
TAATACGACTCACTATA-Segmento BTV-
 GGCCGGCATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATT
 CCGAGGGGACCGTCCCCTCGGTAATGGCGAATGGGACCTAGCATAAC
 CCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

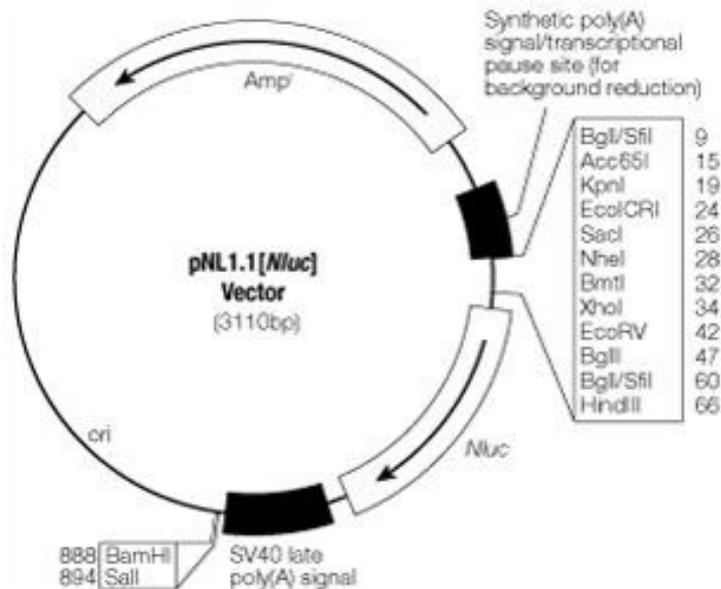
pUC57-Amp pUC57-Amp is a derivative of pUC19 plasmid. pUC57 MCS contains 6 restriction sites with 3' sticky ends, which are resistant to E.coli exonuclease III. The exact position of genetic elements is shown on the map (termination codons included). DNA replication initiates at position 890 (+/-1) and proceeds in indicated direction. The bla gene coding for beta-lactamase confers ampicillin resistance.





Created with SnapGene®





- d) Gama de hospedadores del vector: **Todos los plásmidos son amplificados en bacteria.**
- e) Características de la movilidad del vector: **No aplica**
- i) factores de movilización
 - ii) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?
- f) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos? **Todos los plásmidos son amplificados en bacteria, por tanto contienen un origen de replicación y el gen de resistencia a Ampicilina. Ninguno de estos genes (u otras secuencias de bacterias) son transferidos a BTV, y solo se utilizan para la propagación del plásmido en cultivos de bacterias.**

5) Información del inserto:

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

Segmento 1 BTV-1 (3944 nucleótidos): Gen Bank: KP820944.1

Segmento 2 BTV-1 (2940 nucleótidos): Gen Bank: FJ969720.1

Segmento 3 BTV-1 (2772 nucleótidos): Gen Bank: KP821186.1

Segmento 4 BTV-1 (1981 nucleótidos): Gen Bank: KP821306.1



Segmento 5 BTV-1 (1774 nucleótidos): Gen Bank: KP821426.1

Segmento 6 BTV-1 (1635 nucleótidos): Gen Bank: FJ969723.1

Segmento 7 BTV-1 (1156 nucleótidos): Gen Bank: KP821668.1

Segmento 8 BTV-1 (1125 nucleótidos): Gen Bank: KP821788.1

Segmento 9 BTV-1 (1049 nucleótidos): Gen Bank: FJ969727.1

Segmento 10 BTV-1 (822 nucleótidos): Gen Bank: KP822029.1

Segmento 2 BTV-4 (2926 nucleótidos): Gen Bank: AJ585125.1

Segmento 6 BTV-4 (1638 nucleótidos): Gen Bank: AJ586699.1

Segmento 2 BTV-8 (2939 nucleótidos): Gen Bank: AM498052.2

Segmento 6 BTV-8 (1637 nucleótidos): Gen Bank: AM498056.2

Segmento 5 BTV-1 con secuencia 2A de PTV-1 (1858 nucleótidos):

gttaaaaaagtctctagtggcaaccaccaaacatggagcgccttttgagaaaatacaacatcagtgaggattatgcaaatgc
cacgagaactttttggctatttcaccacaatggacttgagcgcctctaaaaaggaattgtttattcaatgggatgtgcgttaaca
aaatfttgagagagcgcgatgcggcaactgatgcggaggagccggcgaaggcatatagattagtgaattggcaaagga
ggcaatgatgatcgggaaacagtctggctcaatgctcaaaagcctttctcaacatataagaggatgtcgaagggaagat
gaagcgggtgcggggtgcaactgctgaggattaccgcaaaagtgggatgatggatgaggccgtgaagcaatctgcattggtt
aattcggaaagagtttagattgatgattctttcagcaatgccctatactatgtaccaatcaagagggtcaaatcgtgaatcc
aacattcatatcgagatatacgccaaattgcatactatttctataatccggatgcggccgatattggatcgtacaaattgtttgg
cattcgtggacagcacaatcaaatcaaacgtgaagttgagagacaaattaacacatgcccactgatacaaaagcaga
gtgttcaagtaattgttctaccgattcagctgatcaattcttgaggatggatgatttcgcaagcattttaataggtatgctcgc
ggctatacagcaatactgagagttggttacgctgaagaggtcaggtatgtgcagcagcttttgggagggtccaacaggtga
attccattacatcagatgatgctgataagacgcgattcccaacgcgcgatcgcagcagcgtggaagcgcgggtgaggagat
cgggtgatgagaattggcagagctggctgttacctatgattattgtcgcgaaggattagatcacgcggatcgggtgggaatgg
cttattgattacatggataggaagcatacgtgcagctgtgctacctgaagcactcgaagcagatccaacctgtggtgtgattg
atgtacgcgcagatcagagtaaacggggtgctcgcattcaagacgggtgaagatcgaagaacatgtgggaaatgattcggtttt
aagacaaagttagtgcgatgaacaaattggcagaatcggagatcattattatacaacaattgttactggagcgggaagct
ttgattacaactgcaattcacattcaccgctggattagagggtgtggcatctggaacgatgaaggatggcaggaaggtatttc
atgcttgacgcgtactactgagatgggaactgacaaaggcgaacgcagcgcgttgctcaggtgttctgctcgtgtgttat
ggatatgcgccgcgtgcagatgggacgataaccggattggaataatcttgaagtttctggatatcattctgaaaggccgga
actcagtgaggatgaagatgagagggttatgctacgatgtttgagatggttcgatgcattatcactctatgctatgcagaaaag
gttcacttcgctgggttcgcggcgcctgcgtgagagcggggaagttatcaatctcgcgtgcgcgatgctcagatgtgat
ggagtatggcagcggcgcgaccaacttagcctgctgaacaggcgggcgatgtggaagaaaaccgggcccaccgggt
agatctgctagctagttactgactctgtttctgtttctcttttctatttctgcttcttagcactctactagaacttttcaactac
Secuencia 2^a de PTV-1 (57 nucleótidos):
gcgaccaacttttagcctgctgaaacaggcgggcgatgtggaagaaaaccgggccc

Genes reporteros que serán introducidos en el genoma de BTV.



mCherry (708 nucleótidos):

atggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgctcaaggtgcacatggagggctccgtg
aacggccacgagttcgagatcagggcgagggcgagggcccccctacgagggcaccagaccgccaagctgaaggt
gaccaaggggtggccccctgcccttcgcttgggacatcctgtcccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcac
cccggcgacatccccgactactgaaactgtccttccccgagggctcaagtgggagcgcgtgatgaacttcgaggacggc
ggcgtggtgaccgtgaccaggactcctcctgcaggacggcgagttcatctacaaggtgaagctgcgcggcaccaacttc
ccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctgggagggcctcctccgagcggatgtaccccaggacggcg
ccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaaggacggcgccactacgacgctgaggtcaagaccactacaa
ggccaagaagcccgtgacgtgcccggcgcctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactaca
ccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggccgacctccaccggcgcatggacgagctgtacaag

Venus (717 nucleótidos):

atggtgagcaagggcgaggagctgtaccgggggtggtgccatcctggtcagctggacggcgacgtaaacggccaca
agttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatccacactcggcaagctgacctgaagctcatctgcaccaccggcaag
ctgcccgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctcggctacggcctgcagtgcttcgccctaccgccaccatgaag
cagcacgacttctcaagtccgcatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcaaggacgacggcaactaca
agaccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtgaaccgcatcgagctgaagggcactcactcaaggagga
cggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatcaccgccgacaagcagaagaacg
gcatcaagggcaactcaagatccgccacaacatcaggacggcgccgtgcagctcggcaccactaccagcagaacac
ccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccactactgagctaccagccaagctgagcaaaagacccaacg
agaagcgcgatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgccggggtacactctggcatggacgagctgtacaag

NanoLuc (516 nucleótidos):

atggtcttcacactcgaagatttcgttggggactggcgacagacagccggctacaacctggaccaagtcttgaacagggag
gtgtgtccagtttcttcagaatctcgggggtgtccgtaactccgatccaaaggattgtcctgagcgggtgaaaatgggctgaagat
cgacatccatgcatcatcccgtatgaaggtctgagcggcgacccaaatgggcccagatcgaaaaatfttaaggtggtgtacc
ctgtggatgatcatcactttaaagtgatcctgcactatggcacactggtaatcagcggggttacgccgaacatgatcgactatt
cggacggccgtatgaaggcatcggcgtgttcgacggcaaaaagatcactgtaacagggaccctgtggaacggcaacaaaa
ttatcgacgagcgcctgatcaaccccagggctccctgctgtccgagtaaccatcaacggagtgaccggctggcggctgtg
cgaacgcattctggcgtaa

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

Segmentos 1 a 10 del genoma de BTV: Dichos segmentos/genes codifican para las diferentes proteínas virales de BTV y tienen las mismas funciones.

Tabla 1. Segmentos genómicos y proteínas codificadas por BTV.



Segmento genómico	Proteína/s (aa)	Localización	Función
1	VP1 (1302)	Interior del Core	• RNA Polimerasa RNA dependiente (RpRd).
2	VP2 (956)	Cápside externa	• Proteína estructural específica del serotipo. • Hemaglutinina. • Entrada en la célula.
3	VP3 (901)	Core	• Proteína estructural, forma el soporte para el anclaje de los trímeros VP7. • Necesaria para el ensamblaje del virión.
4	VP4 (644)	Interior del Core	• Enzimas que cataliza la adición de residuos cap a los ARNm, guaniltransferasa / metiltransferasa.
5	NS1 (552)	No estructural	• Forma túbulos en el citoplasma celular. • Función desconocida.
6	VP5 (526)	Cápside externa	• Proteína estructural. • Permeabilización celular.
7	VP7 (349)	Superficie del Core	• Proteína estructural. Posible función en la entrada.
8	NS2 (357)	Interior del Core No estructural	• Forma los cuerpos de inclusión, fosfoproteínas que une ssRNA.
9	VP6 (329) NS4 (77-79)	No estructural	• Une ARNs y ARNbc, actividad helicasa. • Posible función protectora ante degradación de ADN. • Antagonista de interferón y determinante de virulencia.
10	NS3/NS3A (229/226) NS5 (80)	No estructural	• Glicoproteína, participa en la salida del virión. • Puede participar en la modulación de la transcripción celular. • Puede tener función específica en el nucléolo.

Proteínas fluorescentes y bioluminiscentes: Si bien las funciones de la fluorescencia y bioluminiscencia no se conocen para todos los animales, generalmente la fluorescencia y bioluminiscencia se usan para advertir o evadir a los depredadores, para atraer o detectar presas y para la comunicación entre miembros de la misma especie. En nuestro sistema, los genes reporteros servirán para visualizar y cuantificar las infecciones virales.

Secuencia 2A de PTV-1: Es un péptido de 19 aminoácidos de longitud, que puede inducir un salto ribosómico durante la traducción de una proteína en una célula. La secuencia 2A es empleada por los picornavirus para producir diferentes proteínas/péptidos a partir de un mismo marco de lectura. En nuestro sistema esta secuencia será utilizada para producir la proteína viral NS1 (codificada en el segmento 5) y el gen reportero desde un mismo marco de lectura.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Los genes reporteros serán amplificados mediante PCR e introducidos en el segmento 5 modificado que contienen la secuencia 2A. Posteriormente, células que expresan la polimerasa T7 (BsrT7) serán transfectadas con los 10 plásmidos que



codifican el genoma completo de BTV. Finalmente el virus será recuperado del sobrenadante celular y amplificado en células susceptibles a BTV, para generar un stock de trabajo.

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

Ya se ha descrito la función de cada proteína en la sección b.

e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto: **No aplica.**

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente? **Si**

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

h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese. **No**



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? **No**

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?: **No**

En caso afirmativo:

i) número de copias:

ii) localización cromosómica:

iii) secuencias colindantes

iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?:

c) Si se trata de un virus: **Si**

i) La inserción es específica

ii) La inserción se produce al azar

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas

d) Análisis moleculares realizados relativos a la expresión del producto deseado (*PCR, Northern, secuenciación, otros*):

iv) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

vi) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto. **Los análisis serán realizados una vez se obtenga el OMG.**

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

Tabla 1. Resumen de los virus recombinantes que serán generados y características genotípicas.



Virus recombinante	Segmento 2 (VP2)	Segmento 6 (VP5)	Segmento 5 (NS1)	Segmentos 1, 3, 4, 7, 8*, 9 y 10.
rBTV-1	BTV-1	BTV-1	NS1 silvestre	BTV-1
rBTV-1/mCherry	BTV-1	BTV-1	NS1-2A	BTV-1
rBTV-1/Venus	BTV-1	BTV-1	NS1-2A	BTV-1
rBTV-1/Nluc	BTV-1	BTV-1	NS1-2A	BTV-1
rBTV-4	BTV-4	BTV-4	NS1 silvestre	BTV-1
rBTV-4/mCherry	BTV-4	BTV-4	NS1-2A	BTV-1
rBTV-4/Venus	BTV-4	BTV-4	NS1-2A	BTV-1
rBTV-4/Nluc	BTV-4	BTV-4	NS1-2A	BTV-1
rBTV-8	BTV-8	BTV-8	NS1 silvestre	BTV-1
rBTV-8/mCherry	BTV-8	BTV-8	NS1-2A	BTV-1
rBTV-8/Venus	BTV-8	BTV-8	NS1-2A	BTV-1
rBTV-8/Nluc	BTV-8	BTV-8	NS1-2A	BTV-1

* Todos los virus recombinantes generados tendrán una mutación silenciosa en el segmento 8 para distinguirlos de aislados naturales.

- ¿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: **No**
- ¿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**
- Marcadores específicos del OMG: **Todos los virus recombinantes generados tendrán una mutación silenciosa en el segmento 8 (que codifica para la proteína**



NS2). Asimismo, los genes reporteros y la secuencia 2A, también servirán como marcadores específicos.

- 3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*): **Se espera que el OMG tenga la misma estabilidad genética que los virus aislados en la naturaleza.**
- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos: **No**
- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
 - a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: **PCR, secuenciación, western blot, técnicas de biología molecular, análisis de expresión del gen reportero (fluorescencia o luminiscencia).**
 - b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: **Los virus silvestres son generalmente aislados directamente de sangre de ovejas infectadas tras un pase en cultivos celulares (células de insecto KC). Todos los aislados naturales ya están disponibles en el laboratorio.**

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: **30 ml con un título viral aproximado de 10^6 unidades formadoras de placa (PFU)/ ml.**
 - b) Número de plantas:
 - c) Número de animales: **La virulencia de los virus recombinantes de BTV generados será testada en ratones A129 IFNAR(-/-). Para ello, grupos de ratones (N=5/grupo) serán inoculados por vía subcutánea con distintas dosis (10 a 10,000 PFU/animal) de cada virus. Para analizar la virulencia y replicación de los virus generados, se evaluará morbilidad (pérdida de peso, signos clínicos), mortalidad y replicación viral en sangre.**

Para los ensayos en oveja se utilizarán un máximo de 30 animales (en grupos de 5 ovejas), que serán infectados con los virus seleccionados (no todos los virus recombinantes serán testados en ovejas). Los animales recibirán una dosis (10^5 PFU/animal) de virus por vía subcutánea en 1ml de DMEM.



- 3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

5 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 asociadas las actividades con los OMG).

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

Desarrollo de ensayos para la detección rápida, eficiente y a gran escala de anticuerpos neutralizantes y/o antivirales frente al virus de la lengua azul (Bluetongue virus: BTV). Los objetivos interrelacionados de la actividad son: 1) generar sistemas de genética reversa basados en plásmidos, para los serotipos de BTV circulantes en España (BTV-1, -4, y 8). 2) Generar virus BTV recombinantes que expresen diferentes genes reporteros, tales como proteínas fluorescentes o bioluminiscentes, como una herramienta biotecnológica que facilitará la evaluación, monitorización y cuantificación de la infección por BTV, sin necesidad de usar otros ensayos secundarios más lentos y costosos. Estos virus reporteros servirán por ejemplo para evaluar la eficiencia de vacunas o la prevalencia del virus en un determinado área.

Se realizarán estudios en cultivos celulares susceptibles a la infección por BTV para evaluar la replicación del virus y en su caso la expresión de los genes reporteros. Para ello se usarán líneas celulares establecidas de mamíferos o insectos. Se espera que la replicación de los virus generados en cultivos celulares sea similar a la de los aislados naturales.

Además, se realizarán estudios para evaluar/comparar la patogenicidad de los virus recombinantes generados y los aislados naturales. Dichos estudios se llevarán a cabo en uno modelo de ratón susceptible a la infección por BTV, que mimetiza la enfermedad severa observada en ovejas, huésped natural del virus. Estos ratones susceptibles, Knockout IFN α / β R-/- (A129), están modificados genéticamente para no expresar el gen que codifica el receptor de interferón tipo I IFNAR(-/-) y proceden de laboratorios MARSHALL BIORESOURCES (<https://www.marshallbio.com/mice>). Posteriormente se analizará la patogenicidad en ovejas, el hospedador natural de BTV. In vivo, también se espera que los virus recombinantes generados tengan niveles de patogenicidad similares al de los aislados naturales.

Todos los ensayos (in vitro e in vivo) se realizarán en la instalación de tipo 3 del CISA-INIA-CSIC (notificación A/ES/00/I-01), del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC) autorizada con anterioridad por el Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente (CIOMG) mediante resolución con fecha 04/12/2001.

- 5) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa (*señalar nombre y ubicación*), y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG. En el caso de centros españoles, indicar el número de notificación si se conoce:



El OMG se generará en 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.

- 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*):

No está previsto el envío de los virus recombinantes generados a otras instituciones nacionales o internacionales. No obstante, no puede descartarse que en el futuro surjan futuras colaboraciones científicas que requieran el envío de alguno de los virus recombinantes generados a otras instituciones, con fines de investigación. En tal caso, el tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación y etiquetado seguirán la legislación internacional y nacional vigente para el transporte de material biológico infeccioso para humanos y animales.

- 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*):

Una vez obtenidos los OMGs mediante genética reversa (utilizando células BsrT7) se amplifican en células de mamíferos Vero o BHK o en células de insecto KC. El virus obtenido del sobrenadante celular será centrifugado y almacenado a -80°C en alícuotas de trabajo perfectamente etiquetadas.

Ensayos de replicación y expresión en cultivos celulares: Células de mamíferos Vero, BHK o de insecto KC, serán infectadas a baja o alta multiplicidad de infección y los niveles de replicación serán determinados mediante ensayos de placa. Los niveles de expresión de proteínas serán evaluados mediante inmunofluorescencia o western blot utilizando anticuerpos específicos (frente a las proteínas virales VP7, NS1, NS2, etc) o sueros policlonales. Además, en el caso de los virus que expresen un gen reportero, también se evaluará la expresión del mismo. Finalmente, utilizando los virus reporteros, se pondrán a punto ensayos de neutralización, donde los niveles de replicación viral o neutralización correlacionen con la expresión de los genes reporteros.

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/>



Ensayos de patogénesis con modelos animales: Para los estudios de patogénesis se utilizará primero el modelo animal de ratón IFNAR(-/-) (Knockout IFN α / β R-/- (A129) procedentes de laboratorios MARSHALL BIORESOURCES (<https://www.marshallbio.com/mice>)), que no expresan el gen del receptor de interferón IFN α / β (Tipo I). Posteriormente se analizará la patogenicidad en ovejas, el hospedador natural de BTV. Los ensayos de patogenicidad con ratones IFNAR(-/-) y ovejas se realizarán en un Box de nivel 3 de bioseguridad del CISA-INIA (Valdeolmos, Madrid), el cual está adaptado para el trabajo con BTV. Este box está equipado con una cabina de flujo laminar de clase IIA/B3.

REFERENCIAS

1. Ortego J, de la Poza F, Marín-López A. (2014) Interferon α/β receptor knockout mice as a model to study bluetongue virus infection. *Virus Res.* 2014 Mar;182:35-42. doi: 10.1016/j.virusres.2013.09.038. Epub 2013 Oct 4.
 2. Marín-López A, Bermúdez R, Calvo-Pinilla E, Moreno S, Brun A, Ortego J. (2016) Pathological Characterization Of IFNAR(-/-) Mice Infected With Bluetongue Virus Serotype 4. *Int J Biol Sci.* 2016 Nov 24;12(12):1448-1460. doi: 10.7150/ijbs.14967. eCollection 2016.
 3. Jiménez-Cabello L, Utrilla-Trigo S, Calvo-Pinilla E, Moreno S, Nogales A, Ortego J, Marín-López A. Viral Vector Vaccines against Bluetongue Virus. *Microorganisms.* 2020.
 4. Pretorius JM, Huismans H, Theron J. Establishment of an entirely plasmid-based reverse genetics system for Bluetongue virus. *Virology.* 2015.
 5. Utrilla-Trigo S, Jiménez-Cabello L, Calvo-Pinilla E, Marín-López A, Lorenzo G, Sánchez-Cordón P, Moreno S, Benavides J, Gilbert S, Nogales A, Ortego J. The Combined Expression of the Non-structural Protein NS1 and the N-Terminal Half of NS2 (NS2(1-180)) by ChAdOx1 and MVA Confers Protection against Clinical Disease in Sheep upon Bluetongue Virus Challenge. *J Virol.* 2021.
- 8) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse:

La zona de contención biológica de 10.824 m², posee unas características arquitectónicas y funcionales reconocidas internacionalmente para la consecución de la bioseguridad.

La característica principal del laboratorio es proporcionar un grado de estanqueidad total para evitar la liberación el medio externo de cualquier agente patógeno sobre el que se esté llevando a cabo alguna línea de investigación.

Para llevar a cabo unas correctas medidas de seguridad, el Centro está diseñado siguiendo unos 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 de puertas con cerradura de seguridad y ajuste neumático.

El Centro presenta un modelo tipo “sandwich” 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 todo el sistema de filtración de Alta Eficacia del aire y la planta inferior está habilitada para los procesos de gestión de residuos sólidos y efluentes y para la entrada y salida de animales y material mediante sistemas SAS y Airlocks.

Para asegurar un funcionamiento correcto incluso bajo situaciones de emergencia, todos los dispositivos de seguridad se encuentran instalados de forma redundante (duplicados) o por triplicado.

Dentro de las características funcionales, se encuentran:

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

- Existe establecido en toda la zona Biocontenida, un mantenimiento de la presión negativa respecto a la atmosférica en gradiente diferencial unidireccional de flujo continuo en laboratorios y en cascada en boxes de experimentación de pasos de ente 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, en ningún momento se recircula aire.

- El aire de salida es filtrado mediante un sistema simple o doble seriado de filtros HEPA H14 (High efficiency Particulate Air) que consta de 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 con 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.

- **Control 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 dentro 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 incluyen la obligación de descontaminación por arrastre y dilución gracias a la toma una ducha automática de agua de 3 minutos de duración.

Bajo ningún concepto es posible extraer cualquier objeto de dentro 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 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, materia o superficies contaminados 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 la situación 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 Contención, 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 estas 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 en el Centro.

Estas cuarentenas varían entre los 3 y 5 días 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 va a desarrollar las actividades con OMGs del virus de la lengua azul, además de las medidas reflejadas, ofrece:

- Inactivación de residuos en CSB mediante procedimientos normalizados.
- Inactivación de contenedores en las duchas de 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 declara 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:

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:

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; Secretaría General del Ministerio de Medio Ambiente (nº registro salida 8443).

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:



Las normas básicas de bioseguridad seguir son las recogidas en el Manual de Bioseguridad para trabajos en el animalario con virus de la lengua azul y Manual de Procedimientos Generales de Bioseguridad para trabajos con virus de la lengua azul.

El personal tiene experiencia en trabajos en box NCB3 y técnicas de laboratorio con la infraestructura específica.

- 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.

- 3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Limpieza: Se dispone de personal entrenado específico de limpieza para áreas NCB3 comunes. 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:

In situ: Solidos:

Dos ciclos por autoclave de vapor 134°C - 18 minutos



Tratamiento químico superficial por ducha química o gas en SAS o Airlocks

Tratamiento químico por inmersión en Dunk Tank

Líquidos:

Tratamiento termo-químico de efluentes

Aire:

Filtración HEPA H14 simple o doble seriada.

Descontaminación por inyección de gas (formaldehído o peróxido de hidrógeno gas) antes de su retirada de caja.- Sistema adicional bag in – bag out

2º Tratamiento del filtro por autoclave de vapor antes de su salida del NCB3.

Exterior: Una vez tratados “in situ”, retirada de vidrio y en su caso de residuos biosanitarios especiales o clase II por gestor acreditado para tratamiento en incineración o autoclave de vapor.

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

- 1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Indicadas en Plan de Evacuación

- 2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Reflejados en procedimientos específicos para el virus de la lengua azul

Reflejados en Plan de Evacuación

- 3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

Manual de bioseguridad para animalario “lengua azul”.

Plan de Evacuación

Procedimientos de Bioseguridad específicos para el virus de la lengua azul 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-INIA/CSIC); Centro Nacional Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA/CSIC); Ministerio de Ciencia e Innovación**
Dirección postal: **Carretera de Algete a El Casar de Talamanca s/n; Valdeolmos - Alalpardo; 28130 Madrid**
- 2) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: **Esther Esteban Rodrigo**
NIF: **05271582M**
Cargo: **Directora del INIA**
Tel:
Fax:
Correo electrónico: **esther.esteban@inia.es**
- 3) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos: **Aitor Nogales González / Francisco Javier Ortego Alonso**
NIF: **51986340S / 50165853R**
Cargo: **Científico Titular de OPIs / Científico Titular de OPIs**
Tel: **91 6202300**
Fax: **91 6202247**
Correo electrónico: nogales.aitor@inia.csic.es / ortego@inia.csic.es
- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
Nombre y apellidos: **Laura Pérez Palancar**
NIF: **53043241C**
Cargo: **Jefe de Área de Animalario y Seguridad Biológica**
Tel: **91 6202300**
Fax: **91 6202247**
Correo electrónico: **laura.palancar@csic.es**
- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: **Laura Pérez Palancar**



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:

Desarrollo de ensayos para la detección rápida, eficiente y a gran escala de anticuerpos neutralizantes y/o antivirales frente al virus de la lengua azul (Bluetongue virus: BTV). Los objetivos interrelacionados de la actividad son: 1) generar sistemas de genética reversa basados en plásmidos, para los serotipos de BTV circulantes en España (BTV-1, -4, y 8). 2) Generar virus BTV recombinantes que expresen diferentes genes reporteros, tales como proteínas fluorescentes o bioluminiscentes, como una herramienta biotecnológica que facilitará la evaluación, monitorización y cuantificación de la infección por BTV, sin necesidad de usar otros ensayos secundarios más lentos y costosos. Estos virus reporteros servirán por ejemplo para evaluar la eficiencia de vacunas o la prevalencia del virus en un determinado área.

Se realizarán estudios en cultivos celulares susceptibles a la infección por BTV para evaluar la replicación del virus y en su caso la expresión de los genes reporteros. Para ello se usarán líneas celulares establecidas de mamíferos o insectos.

Ensayos de replicación y expresión en cultivos celulares: Células de mamíferos Vero o de insecto KC, serán infectadas a baja o alta multiplicidad de infección y los niveles de replicación serán determinados mediante ensayos de placa. Los niveles de expresión de proteínas serán evaluados mediante inmunofluorescencia o western blot utilizando anticuerpos específicos (frente a las proteínas virales VP7, NS1, NS2, etc) o sueros policlonales. Además, en el caso de los virus que expresen un gen reportero, también se evaluará la expresión del mismo. Finalmente, utilizando los virus reporteros, se pondrán a punto ensayos de neutralización, donde los niveles de replicación viral o neutralización correlacionen con la expresión de los genes reporteros.

Además, se realizarán estudios para evaluar/comparar la patogenicidad de los virus recombinantes generados y los aislados naturales. Dichos estudios se llevarán a cabo en un modelo de ratón susceptible a la infección por BTV, que mimetiza la enfermedad severa observada en ovejas, huésped natural del virus. Estos ratones susceptibles, Knockout IFN α / β R-/- (A129), están modificados genéticamente para no expresar el gen que codifica el receptor de interferón tipo I IFNAR(-/-) y proceden de laboratorios MARSHALL BIORESOURCES (<https://www.marshallbio.com/mice>). Posteriormente se analizará la patogenicidad en ovejas, el hospedador natural de BTV.

Todos los ensayos (in vitro e in vivo) se realizarán en las instalaciones de tipo 3 del CISA-INIA-CSIC (notificación A/ES/00/I-01), del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CSIC) autorizada con anterioridad por el Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente (CIOMG) mediante resolución con fecha 04/12/2001. Los ensayos de patogenicidad con ratones y ovejas se realizarán en un Box de nivel 3 de bioseguridad del CISA-INIA (Valdeolmos, Madrid), el cual está adaptado para el trabajo con BTV. Este box está equipado con una cabina de flujo laminar de clase IIA/B3.



2) Duración prevista de la actividad:

Se prevé un periodo de cinco años desde la recepción de la autorización de la actividad 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).

III. EVALUACIÓN DE RIESGO

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

(En el caso de actividades de tipo 1 se incluirá en este apartado un listado de los principales organismos y material genético utilizados (organismos receptores, organismos donantes, insertos, vectores y organismos modificados genéticamente resultantes), así como la evaluación del riesgo para la salud humana y el medio ambiente de los mismos).

1) Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del:

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

Organismo receptor. **El organismo receptor son virus BTV de los serotipos 1, 4, 8.**

Taxonomía: Orden: Reovirales. Familia: sedoreoviridae. Género: Orbivirus.

Nombre común: Virus de la lengua azul o Bluetongue virus (BTV).

a) Organismo donante.

-Virus de la lengua azul (BTV).

-Genes reporteros.

Proteína fluorescente Venus: Venus es una proteína fluorescente derivada de *Aequorea victoria*.

Proteína fluorescente mCherry: mCherry es una proteína fluorescente derivada de *Discosoma sp.*

Proteína luminiscente NanoLuc: nanoLuc es una proteína bioluminiscente derivada de *Oplophorus gracilirostris*.



- Secuencia 2A del teschovirus porcino 1 (porcine teschovirus 1; PTV-1).
Taxonomía: Familia: Picornaviridae. Género: Teschovirus.

Los genes sintéticos de BTV (incluyendo un gen modificado que contiene la secuencia 2A de PTV-1), serán producidos por la empresa Biomatik o GenScript. Los genes reporteros serán obtenidos mediante PCR de plásmidos comerciales: proteínas fluorescentes mCherry (pCAGGS-mCherry; Addgene #41583), Venus (pCAGGS-Venus; Addgene #127346), o la luciferasa NanoLuc (pNL1.1-Nluc; Promega #N1001). Estas secuencias no presentan ningún tipo de homología con el proteoma humano, ni tampoco inducen patogenicidad y/o virulencia. No hay posibles efectos alérgicos y/o tóxicos.

b) Inserto.

Segmento 1 BTV-1 (3944 nucleótidos): Gen Bank: KP820944.1

Segmento 2 BTV-1 (2940 nucleótidos): Gen Bank: FJ969720.1

Segmento 3 BTV-1 (2772 nucleótidos): Gen Bank: KP821186.1

Segmento 4 BTV-1 (1981 nucleótidos): Gen Bank: KP821306.1

Segmento 5 BTV-1 (1774 nucleótidos): Gen Bank: KP821426.1

Segmento 6 BTV-1 (1635 nucleótidos): Gen Bank: FJ969723.1

Segmento 7 BTV-1 (1156 nucleótidos): Gen Bank: KP821668.1

Segmento 8 BTV-1 (1125 nucleótidos): Gen Bank: KP821788.1

Segmento 9 BTV-1 (1049 nucleótidos): Gen Bank: FJ969727.1

Segmento 10 BTV-1 (822 nucleótidos): Gen Bank: KP822029.1

Segmento 2 BTV-4 (2926 nucleótidos): Gen Bank: AJ585125.1

Segmento 6 BTV-4 (1638 nucleótidos): Gen Bank: AJ586699.1

Segmento 2 BTV-8 (2939 nucleótidos): Gen Bank: AM498052.2

Segmento 6 BTV-8 (1637 nucleótidos): Gen Bank: AM498056.2

Segmentos 1 a 10 del genoma de BTV: Dichos segmentos/genes codifican para las diferentes proteínas virales de BTV y tienen las mismas funciones.

Tabla 1. Segmentos genómicos y proteínas codificadas por BTV.



Segmento genómico	Proteína/s (aa)	Localización	Función
1	VP1 (1302)	Interior del Core	• RNA Polimerasa RNA dependiente (RpRd).
2	VP2 (956)	Cápside externa	• Proteína estructural específica del serotipo. • Hemaglutinina. • Entrada en la célula.
3	VP3 (901)	Core	• Proteína estructural, forma el soporte para el anclaje de los trímeros VP7. • Necesaria para el ensamblaje del virión.
4	VP4 (644)	Interior del Core	• Enzimas que cataliza la adición de residuos cap a los ARNm, guaniltransferasa / metiltransferasa.
5	NS1 (552)	No estructural	• Forma túbulos en el citoplasma celular. • Función desconocida.
6	VP5 (526)	Cápside externa	• Proteína estructural. • Permeabilización celular.
7	VP7 (349)	Superficie del Core	• Proteína estructural. Posible función en la entrada.
8	NS2 (357)	Interior del Core No estructural	• Forma los cuerpos de inclusión, fosfoproteínas que une ssRNA.
9	VP6 (329) NS4 (77-79)	No estructural	• Une ARNs y ARNbc, actividad helicasa. • Posible función protectora ante degradación de ADN. • Antagonista de interferón y determinante de virulencia.
10	NS3/NS3A (229/226) NS5 (80)	No estructural	• Glicoproteína, participa en la salida del virión. • Puede participar en la modulación de la transcripción celular. • Puede tener función específica en el nucléolo.

Proteínas fluorescentes y bioluminiscentes: Si bien las funciones de la fluorescencia y bioluminiscencia no se conocen para todos los animales, generalmente la fluorescencia y bioluminiscencia se usan para advertir o evadir a los depredadores, para atraer o detectar presas y para la comunicación entre miembros de la misma especie. En nuestro sistema, los genes reporteros servirán para visualizar y cuantificar las infecciones virales.

Secuencia 2A de PTV-1: Es un péptido de 19 aminoácidos de longitud, que puede inducir un salto ribosómico durante la traducción de una proteína en una célula. La secuencia 2A es empleada por los picornavirus para producir diferentes proteínas/péptidos a partir de un mismo marco de lectura. En nuestro sistema esta secuencia será utilizada para producir la proteína viral NS1 (codificada en el segmento 5) y el gen reportero desde un mismo marco de lectura.

c) Vector.



Los vectores utilizados para insertar los genes sintéticos no producen ninguna propiedad nociva. Además, los virus recombinantes generados por genética reversa no incorporan ninguna secuencia del vector utilizado.

- El genoma de BTV será sintetizado de novo por una empresa (Biomatik o GenScript), y cada gen/segmento viral será clonado en un plásmido pUC57 y flanqueado por el promotor de la polimerasa T7 en el extremo 5' o por la ribozima del virus de la hepatitis delta y el terminador de la polimerasa T7 en el extremo 3'. Los elementos que flanquean el gen viral, no son incorporados en los virus recombinantes. Plásmido pUC57 para clonar los distintos genes de BTV.

pUC57-Amp pUC57-Amp is a derivative of pUC19 plasmid. pUC57 MCS contains 6 restriction sites with 3' sticky ends, which are resistant to E.coli exonuclease III. The exact position of genetic elements is shown on the map (termination codons included). DNA replication initiates at position 890 (+/-1) and proceeds in indicated direction. The bla gene coding for beta-lactamase confers ampicillin resistance.

-Con el fin de obtener las secuencias de los genes para las proteínas fluorescentes mCherry (pCAGGS-mCherry; Addgene #41583), Venus (pCAGGS-Venus; Addgene #127346), o la luciferasa NanoLuc (pNL1.1-Nluc; Promega #N1001) utilizaremos plásmidos comerciales y los genes serán extraídos mediante PCR y posteriormente clonados en el segmento 5 recombinante y modificado de BTV que contiene la secuencia 2A.

- d) Organismo modificado genéticamente resultante.

Virus recombinantes de BTV generados mediante genética reversa, de los serotipos 1, 4 y 8, los cuales circulan actualmente en España. Además, serán generados virus recombinantes de los mismos serotipos, que expresen los genes reporteros: proteínas fluorescencias Venus o mCherry o la luciferasa NanoLuc. Todos los virus recombinantes generados tendrán una mutación silenciosa (un cambio de nucleótido que introduce un sitio de restricción) en el segmento 8 (que codifica para la proteína NS2). Asimismo, los genes reporteros y la secuencia 2A, también servirán como marcadores específicos.

- e) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.

-Los genes de BTV sintetizados tienen las mismas funciones que los genes originales. Por tanto, los virus recombinantes tendrán propiedades similares a los aislados naturales.

La lengua azul es una enfermedad causada por el virus de la lengua azul (Bluetongue: BTV) y transmitida por vectores hematófagos. La enfermedad afecta principalmente a ovejas, aunque también puede afectar a otros rumiantes salvajes y domésticos.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de la lengua azul varían considerablemente entre las distintas especies de hospedadores y las cepas virales. El serotipo no determina la virulencia ya que existen cepas altamente



virulentas y otras más benignas dentro del mismo serotipo. Aunque BTV afecta a muchas especies de rumiantes, el cuadro clínico completo de la enfermedad aparece generalmente en la oveja. Los signos clínicos pueden ser fiebre alta durante algunos días así como congestión, descarga ocular y nasal, apatía, rigidez muscular y cojera. Se da un deterioro de la lana y del estado general del animal, además se produce una pérdida de peso y se reduce la producción de leche. Las lesiones típicas son edema facial, inflamación del rodete coronario (coronitis), laminitis, necrosis en músculo esquelético y cardíaco, edemas y úlceras necróticas en la mucosa oral, edema pulmonar y trombosis vascular. Además, a veces se produce cianosis de la lengua, lo que da nombre a la enfermedad de la lengua azul, pero es un signo poco común. Otro signo peculiar de la enfermedad es la aparición de hemorragias en la base de la arteria pulmonar.

- No se han descrito los genes que codifican para proteínas fluorescentes o bioluminiscentes, o la secuencia 2A de PTV-1 por sí sola, como factores de virulencia de ningún virus o agente biológico. En el caso de los genes reporteros no se ha descrito un papel en patogénesis.

f) Efectos para el medio ambiente.

Los OMG generados [virus recombinantes de BTV con o sin genes reporteros] no producen efectos distintos para el medio ambiente, que los que puedan producir los aislados naturales.

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"/>

La generación de los OMG y los estudios “in vitro e in vivo” en los que se van a utilizar se realizarán en un Grado de Confinamiento Tipo 3.

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).

La actividad se va a llevar a cabo en un laboratorio y un box de experimentación animal del CISA-INIA-CSIC, instalación con nivel de



bioseguridad tipo 3. El OMG estará confinado a este espacio y no saldrá en ningún momento del mismo.

Toda la actividad con animales se situará y desarrollará dentro de un box NCB3 que presenta:

- **Ubicación en espacio NCB3,**
- **Acceso al animalario independiente a través de “prerom” de doble puerta con apertura por huella.**
- **Puertas de acceso a área de box estancas por junta activa (neumáticas),**
- **Vestuario interior por box limpio –sucio**
- **Ducha de descontaminación exclusiva por arrastre y dilución (agua)**
- **Puertas secundarias de acceso a espacio de box estancas por junta estática,**
- **Cámaras de vigilancia en box y ojo de buey para vigilancia presencial,**
- **Presión negativa en 30 Pa mínimo respecto a pasillo de animalario y de 45Pa de este respecto a exterior,**
- **Doble filtración HEPA en aire de extracción,**
- **Valvulería automática “airtigh” en impulsión,**
- **Drenajes con conexión directa a líneas de tratamiento de efluentes por sistema termoquímico validado física y microbiológicamente con carácter anual y microbiológicamente con carácter trimestral,**
- **Seguimiento de parámetros de biocontención de la Instalación NCB3 por control informático duplicado (interior-exterior), dotado de sistemas de alarma con comunicación por in situ y por e-mail,**
- **Suministro eléctrico triple (dos líneas de alta tensión, dos centros de transformación (alta-media), dos grupos electrógenos, dos UPS/SAI.**
- **Presencia de personal de mantenimiento correctivo, preventivo y predictivo, 24 horas/día; 365 días /año.**

El riesgo de exposición es muy bajo al disponer de rack ventilado para el aislamiento de ratones y Cabina de Seguridad Biológica Clase II A para toma de muestras y manipulación de animales.

La cabina se validará “in situ” anualmente por empresa ajena y se verifica por personal propio de seguridad biológica.

No hay riesgo de contagio por contacto

El riesgo de contaminación indoor out door por estas razones es prácticamente inexistente.

El nivel de biocontención aplicado excede en determinados parámetros el exigido por la legislación para las operaciones confinadas de tipo 3.



El servicio de Bioseguridad verifica, vigila y comprueba periódicamente a nivel interno todos los métodos y sistemas de inactivación biológica y esterilización mediante la utilización de microorganismos testigo utilizando diferentes métodos.

Se dispone de procedimientos escritos de bioseguridad para cualquier tipo de operación donde se especifican las normas de bioseguridad, equipos de protección individual necesarios, limpiezas y biodescontaminaciones, cualificaciones y validaciones físicas y microbiológicas, traslado de muestras, envíos y paquetería, accesos de personas, animales y objetos independientes, establecimiento de cuarentenas y gestión de residuos, entre otros

Se imparten curso específico para animalario teórico y práctico antes de iniciar la actividad. Se realizan seminarios periódicos.

La instalación completa dispone de un plan de emergencias y evacuación que ha intentado cubrir todos los procedimientos de actuación ante supuestos de incidente, accidente y emergencia.

- b) Concentración y escala utilizadas.

Se utilizarán en los distintos ensayos aproximadamente 30 ml de los OMG a una concentración de 10^6 unidades formadoras de placa (PFU) /ml.

Ensayos de replicación y expresión en cultivos celulares: Células de mamíferos Vero o de insecto KC, serán infectadas a baja (0.001) o alta (2) multiplicidad de infección y los niveles de replicación o expresión de proteínas serán determinados.

La virulencia de los virus recombinantes de BTV generados será testada en ratones A129 IFNAR(-/-). Para ello, grupos de ratones (N=5/grupo) serán inoculados por vía subcutánea con distintas dosis (10 a 10,000 PFU/animal) de cada virus. Para analizar la virulencia y replicación de los virus generados, se evaluará morbilidad (pérdida de peso, signos clínicos), mortalidad y replicación viral en sangre.

Para los ensayos en oveja se utilizarán un máximo de 30 animales (en grupos de 5 ovejas), que serán infectados con los virus seleccionados (no todos los virus recombinantes serán testados en ovejas). Los animales recibirán una dosis (10^5 PFU/animal) de virus por vía subcutánea en 1ml de DMEM.

- 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 virus se maneja utilizando la infraestructura de contención del laboratorio NCB3. Se realizan infecciones en líneas celulares permisivas (Vero, BHK, KC). Las infecciones se realizan siempre en cabinas de seguridad biológica (con filtros HEPA) presentes en el laboratorio NCB3. Los cultivos celulares infectados se incuban en un incubador a 37°C. Las infecciones se realizan siguiendo protocolos de infección previamente descritos y bien establecidos en el laboratorio y el campo. Todos los procesos de manipulación se llevarán a



cabo en cabina de bioseguridad y usando equipos de protección individual (bata, mascarilla y guantes). Los residuos biosanitarios líquidos se inactivarán con lejía durante 30 minutos. Los residuos biosanitarios sólidos serán posteriormente autoclavados y retirados por una empresa autorizada.

La utilización de animales (ratones y ovejas) supondría un riesgo limitado. Consideramos que el riesgo real es poco probable, casi desdeñable, dadas las estrictas medidas de contención en las que se realiza la actividad dentro de la instalación CISA-INIA-CSIC, que impedirían la liberación estos animales al medio ambiente.

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

Actividad confinada de Tipo 3. Actividad en la cual el grado 3 de confinamiento es suficiente para proteger la salud humana y el medio ambiente.

- 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) se encuentra ubicado a 700 metros de la localidad de Valdeolmos.

Valdeolmos presenta una densidad de población escasa (< 1000 habitantes). Se asienta en una penillanura a una altitud de 685 m sobre el nivel del mar.

Se encuentra rodeado de tierras de cultivo de secano (trigo, centeno, avena) y no dispone cercana, ninguna explotación ganadera. Es zona CEPA.

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 emergencias 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.