



**PARTE A Y C**

DIRECCION GENERAL CALIDAD Y  
EVALUACIÓN AMBIENTAL

**Actividades de  
tipo 3 y 4**

COMISIÓN NACIONAL DE  
BIOSEGURIDAD

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

**I. INFORMACIÓN GENERAL**

**1. Responsables de la actividad**

**a. Entidad**

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

Dirección postal: **Torre Marimon, Crt C-59 km 12,1; 08140, Caldes de Montbui**

**b. Representante legal de la entidad**

Nombre y apellidos: **Josep Usall Rodié**

NIF: **40.893.753-Y**

Cargo: **Director General**

Tel: **934.674.040**

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

**c. Responsable científico de la actividad**

Nombre y apellidos: **Fernando Rodriguez González**

NIF: **13.763.889-E**

Cargo: **Investigador**

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

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

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

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

NIF: **35.082.196-C**

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

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

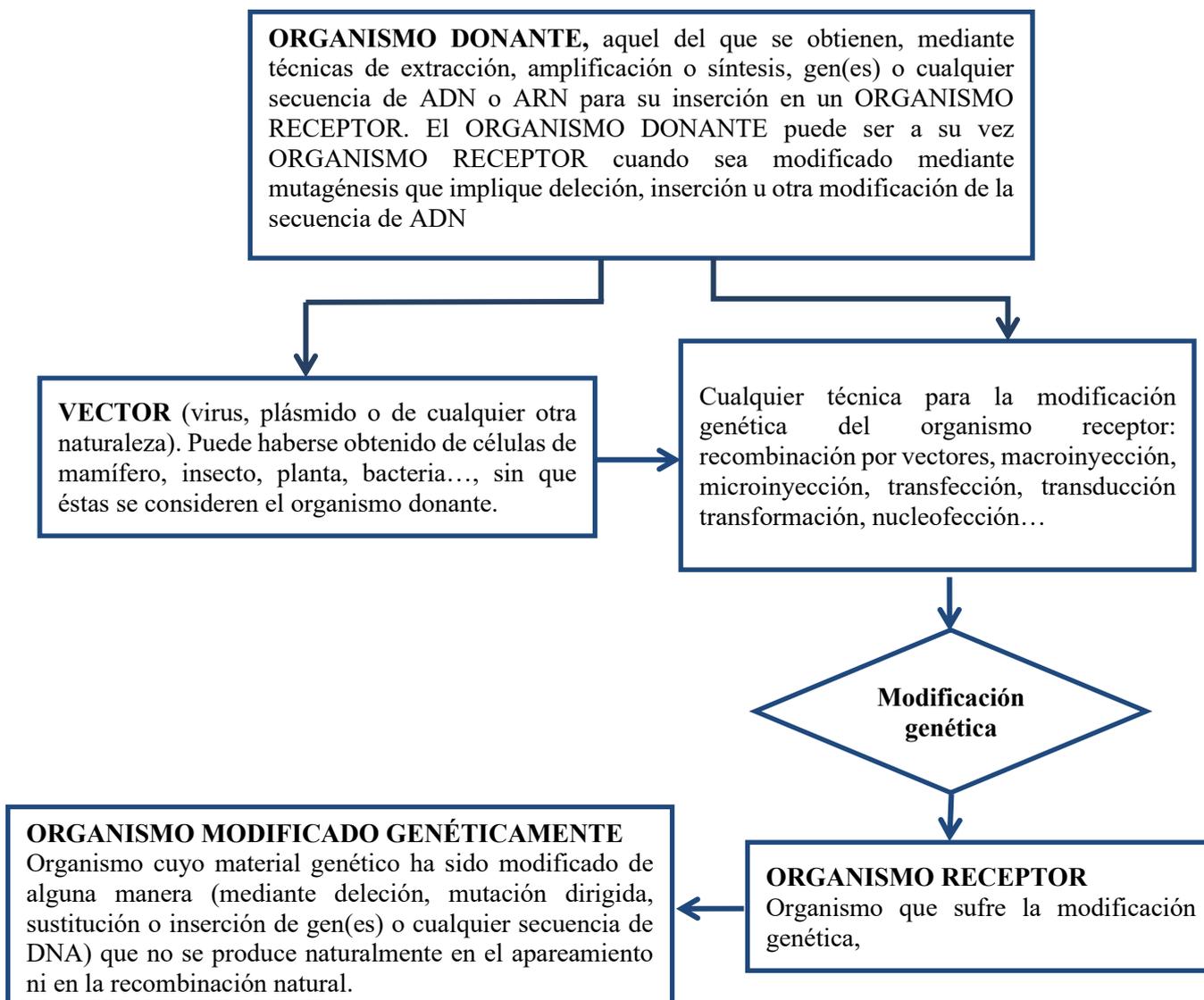
Correo electrónico: **[xavier.abad@irta.cat](mailto:xavier.abad@irta.cat)**

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

**Xavier Abad**



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





## II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

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

SI  NO

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

- Nombre de la convocatoria:

- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

- Organismo financiador:

Otro tipo de financiación<sup>2</sup>



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

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

- Fecha de autorización de la instalación:

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

- Nombre de la instalación de origen del OMG:

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

<sup>1</sup>TASAS

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

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

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



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

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

En lo que respecta al movimiento del OMG en su importación se cumplirán todos los requerimientos de designación/caracterización del material, etiquetado y marcado y homologación del paquete, según normas IATA, y se contratará un servicio de solvencia contrastada. En caso de enviar muestras biológicas al promotor para su posterior análisis, lo haremos vía World Courier o DHL como transporte de material peligroso, en caso de que sean muestras a ser procesadas a NBS3. El paquete también cumplirá todos los requerimientos de embalaje, marcado y etiquetado prescritos a las normas de la Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA), de forma que no sea posible su ruptura y, por tanto, contaminación del medio ambiente.

### 3. Finalidad de la actividad:

La peste porcina africana (PPA) representa hoy en día la mayor amenaza para la industria porcina en todo el mundo. No hay vacuna ni tratamiento contra el virus de la PPA (VPPA), y actualmente la única forma de luchar contra la enfermedad es el sacrificio de los animales afectados y de los que se encuentran dentro del perímetro del foco de la infección, medidas cuestionables desde el punto de vista tanto ético como económico. Así pues, la necesidad de obtener una vacuna frente a la PPA es máxima. Además, el desarrollo de vacunas de subunidades frente a la PPA será esencial para su uso en zonas libres de la enfermedad, donde la implementación de vacunas vivas atenuadas puede ser complicada por asuntos de bioseguridad. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han permitido identificar varias proteínas del VPPA que son ampliamente reconocidas por animales supervivientes a la PPA (inmunizados con un prototipo vacunal disponible en el laboratorio que consiste en un virus atenuado), y por tanto son buenos candidatos para su incorporación en vacunas de subunidades contra el VPPA. No obstante, no solo la identificación de antígenos es importante, sino que la forma de presentarlos es también clave para el éxito de la formulación vacunal.

Con el fin de utilizar el vector más adecuado, nuestro colaborador industrial nos ha proporcionado con su tecnología basada en el uso del virus recombinante como vector viral. El virus recombinante es ampliamente utilizado como vector viral vivo experimental para la expresión de genes foráneos, ya que codifica por varios genes no esenciales que pueden ser reemplazados por

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

- **(ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas)** del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones.
- **Reglamento (CE) N° 1/2005** del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas [64/432/CEE](#) y [93/119/CE](#) y el Reglamento (CE) N° [1255/97](#). Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE núm. 268, 8.11.2007)
- **Reglamento (CE) N° 1946/2003** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente [Diario Oficial L 287 de 5.11.2003].
- **Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad**. Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: <https://bch.cbd.int/protocol/>
- **[Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances](#)** Edición bianual de la OMS



genes foráneos sin afectar su proliferación en el huésped. VV-VPPAp1g1, VV-VPPAp2g1, VV-VPPAp1g2, VV-VPPAp2g2, and VV-VPPAg3 son vectores virales codificando cada uno para un gen del VPPA. Su utilización en nuestras instalaciones de alta seguridad biológica del IRTA-CReSA permitiría establecer su seguridad y eficacia para ser utilizados en formulaciones vacunales frente al VPPA. Se planea realizar un experimento en el que se inocularán 3 grupos de 5 cerdos domésticos con combinaciones de los vectores virales codificando por proteínas del VPPA. En cada grupo, habrá otro cerdo inoculado con el esqueleto de los vectores virales (el vector viral sin gene foráneo) como control negativo del experimento. Cada dosis de vector viral recombinante será de  $>10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub> en 0.5mL. Para mejorar la respuesta inducida, se inocularán 2 dosis de los vectores virales en un intervalo de 3 semanas. Tres semanas tras la segunda dosis, los animales recibirán un desafío letal con VPPA para evaluar la capacidad protectora de los vectores virales recombinantes codificando por proteínas del VPPA. Durante el experimento se obtendrán muestras de suero, sangre e hisopos nasales para poder medir la respuesta inmune generada por los vectores virales recombinantes y evaluar la protección conferida siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio.

Todos los experimentos se realizarán en las instalaciones de alta biocontención (nivel de bioseguridad 3) del CReSA una vez aprobados por los comités de experimentación animal (IRTA y Generalitat) y el Comité de Bioseguridad del IRTA.

#### 4. Clasificación de la actividad:

*(Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y el anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las Notas de orientación para la evaluación del riesgo).*

Tipo 3

Tipo 4

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

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

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

-Especificar el nombre científico y común:

Virus de la pseudorrabia.



- a.** Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.
- i)** Técnicas de aislamiento: El vector viral se basa en una vacuna licenciada para cerdos domésticos. Se cultiva en una línea celular porcina, que es utilizada como *master cell seed* por nuestro colaborador industrial y se aísla por dilución límite.
  - ii)** Técnicas de identificación: Inmunomarcaje con anticuerpos específicos, qPCR específica y secuenciación completa.
  - iii)** Marcadores genéticos: La secuencia completa del genoma del vector viral está publicada, así como las deleciones que llevan a su atenuación.
  - iv)** Marcadores fenotípicos: No aplica.
  - v)** Estabilidad genética: Estable a largo plazo, confirmado por secuenciación completa utilizando Next Generation Sequencing (NGS).
- b.** La cepa/línea celular receptora: ¿está libre de agentes biológicos contaminantes?
- SI
- Especificar cómo se sabe que está libre de agentes biológicos contaminantes.
- El vector viral, utilizado para manipulaciones genéticas, se obtuvo de un vial de vacuna y fue cultivada en una línea celular porcina, que es utilizada como *master cell seed* por nuestro colaborador industrial y ha sido testada por la ausencia de agentes foráneos siguiendo las instrucciones del Center for Veterinary Biologics (CVB) de los Estados Unidos.
- NO
- Especificar si se conocen o se sospecha cuáles pueden ser.
- 
- c.** Modificación genética anterior:
- SI
- Describir:
- Ciertas regiones del genoma del vector viral fueron deleccionadas debido a pases seriados. Durante los pases en cultivo celular partes de genes virales no esenciales fueron deleccionadas. Las deleciones en el genoma viral hacen que el virus sea atenuado.
- Cambios en virulencia, patogenicidad, tropismo, toxicidad, otros efectos.
- Debido a las modificaciones genéticas descritas en el apartado anterior, la virulencia del virus ha sido atenuada. No se contemplan cambios en el tropismo, la toxicidad ni otros efectos propios del patógeno.
- NO
- d.** Se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos intra/extracelulares (Asignar grupo de riesgo conforme al anexo II de Real Decreto 664/1997 tras evaluación del riesgo específica):



El vector viral es una vacuna licenciada que muestra un fenotipo apatogénico en cerdos. Se considera patógeno en otros mamíferos, pero no en el ser humano. Su potencial alergénico no se ha descrito. No se han clonado secuencias codificando para toxinas en el vector viral.

SI

Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros



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

Su potencial alérgico no se ha descrito. No se han clonado secuencias codificando para toxinas en el vector.

NO

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

SI

NO

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

El vector viral fue licenciada antes de 2000, por lo que toda experiencia adquirida ha sido transferida al equipo de colaboración en el IRTA-CReSA, donde se trabaja con agentes biológicos de hasta nivel de bioseguridad BSL3+.

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

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

SI

- Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

esporas

endosporas

quistes

esclerocios

esporas asexuales (hongos)

esporas sexuales (hongos)

otros, especifíquese

NO

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

Fuera de las condiciones de cultivo el vector viral no puede expandirse, ya que necesita la presencia de células eucarióticas susceptibles. Se espera que el organismo receptor pueda sobrevivir fuera del huésped, pero al ser un virus con envuelta se puede desinfectar/inactivar con distintos métodos: 1-2 minutos de exposición con 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o solución de glutaraldehído al 0.1%. Sin tratamiento los virus con envuelta pueden mantenerse infecciosos hasta 3 días (Howie et al, 2008). No tiene la capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo.

- iii) Posibles nichos ecológicos:

El virus *wild-type* es endémico en bastantes partes del mundo y en poblaciones de jabalíes.

- iv) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:



El vector viral no es contagioso después de la inyección intramuscular debido a las deleciones que contiene. Las deleciones en el genoma del vector viral no permiten la propagación entre animales, por lo tanto, el vector viral no se disemina en el ambiente.

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

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

El vector viral no tiene influencia en la circulación ambiental de compuestos químicos.



ii) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

No se esperan interacciones con otros organismos en el medio ambiente ni tampoco ningún efecto en ningún otro organismo. Los experimentos se realizarán en instalaciones de bioseguridad de nivel 3 (NBS3) para eliminar cualquier probabilidad de que los virus se diseminen en el ambiente.

i. Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor:

El virus *wild-type* está erradicado en poblaciones de cerdos domésticos en partes del mundo, incluso en partes de Europa. El virus *wild-type* del vector viral es endémico globalmente en poblaciones de jabalíes. La transmisión a cerdos domésticos no se ha descrito por el momento.

j. Hábitat natural del organismo:

El virus *wild-type* causa una enfermedad respiratoria y reproductiva en su huésped natural, el cerdo adulto, pero los lechones jóvenes son más susceptibles a la enfermedad. Otras especies podrían verse afectadas después de una infección accidental.

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

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

-Especificar el nombre científico y común:

Virus de la peste porcina africana (VPPA).

a. Se trabaja con él durante la actividad:

SI  NO

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

SI

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

Técnicas de identificación descritas previamente y condiciones de esterilidad para trabajar con el microorganismo.

NO

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

c. Modificación genética anterior:



SI

– Describir:

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

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

El VPPA afecta a cerdos domésticos y jabalíes, causando una patogenicidad caracterizada por una hemorragia interna generalizada que puede provocar mortalidades del 100% en cepas altamente virulentas. Un cerdo o un jabalí infectado muere en apenas 1-2 semanas.

SI  Para:

Humanos

Animales

Plantas

Otros

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

NO

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

SI

NO

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

- g. Método de obtención:

– Extracción

– PCR

– Síntesis *in vitro*

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

Los genes del VPPA han sido seleccionados en base a estudios previos que los han identificado como inductores de respuestas inmunes y por lo tanto como potenciales candidatos para su incorporación en formulaciones vacunales de vectores virales vivos frente el VPPA. Se desconoce la función de una de las proteínas seleccionada dentro del ciclo viral.

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



No.



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

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

La finalidad es la de conseguir vectores virales recombinantes codificando por proteínas del VPPA para su uso en formulaciones vacunales.

2. Tipo de modificación genética:

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

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

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

Otros, especifique:

Recombinación homóloga entre un plásmido donante codificando para un gen del VPPA y las regiones flanqueantes del vector viral receptor.

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

SÍ  NO

En caso afirmativo:

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

El vector de transferencia utilizado fue el plásmido pUC57 (Figura 4 del documento "Supplementary figures"). Este vector no contiene ningún elemento regulatorio para eucariotas conocido. En el sitio de clonación múltiple del vector se clonó: Región 5' flanqueante-promotor-Gen de interés-secuencia polyA-sitio de pausa transcripcional-Región 3' flanqueante.

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

Ver figura 4 del documento "Supplementary figures".

- ii) Si se trata de virus:



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

**b. Gama de hospedadores del vector:**

Sólo para transformación en *E.coli* y recombinación con el vector viral. Este vector no contiene ningún elemento regulatorio para eucariotas conocido.

**c. Características de la movilidad del vector:**

**i) factores de movilización**

No aplica.

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

No aplica.

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

El gen de resistencia a Ampicilina está presente sólo en el plásmido pUC57 pero no en el OMG final.

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

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

Las secuencias de los insertos del VPPA se basaron en: codón de inicio-secuencia de la proteína-codón de stop.

**b. Información sobre los genes estructurales:**

Las secuencias de los insertos del VPPA se basaron en: codón de inicio-secuencia de la proteína-codón de stop. Se desconoce la función dentro del ciclo viral de una de las proteínas del VPPA seleccionadas.

**c. Información sobre los elementos reguladores:**

Las secuencias promotoras y polyA utilizadas por le expresión de las proteínas VPPA son públicas y ampliamente utilizados durante más de 20 años.

**d. ¿Ha sido secuenciada?**

Las secuencias de los genes insertos, así como los elementos localizados entre las secuencias flanqueantes del vector viral apropiadas fueron verificadas por secuenciación del genoma del virus completo utilizando *Next Generation Sequencing* con la tecnología *MiSeq*.

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

No.

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



Se desconoce la función en el ciclo viral de una de las proteínas codificadas.

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

a. Si el vector es un plásmido

i) Se pierde

ii) Se inserta en el genoma

- Aleatoriamente

- En un sitio definido

o Localización cromosómica:

o Secuencias colindantes:

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

iii) Se mantiene en forma episómica

- Número de copias:

- Se dispone de información sobre la estabilidad del vector

b. Si el vector es un virus:

i) Se mantiene en forma episómica

ii) Se inserta en el genoma

- La inserción se produce al azar

- La inserción es específica

o Localización cromosómica:

o Secuencias colindantes:

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

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



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

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



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

### 1. Descripción del OMG final

Con el fin de utilizar el vector más adecuado, nuestro colaborador industrial nos ha proporcionado con su tecnología basada en el uso de virus recombinantes una cepa atenuada como vector viral. El vector viral utilizado es ampliamente utilizado para la expresión de genes foráneos, ya que codifica por varios genes no esenciales que pueden ser reemplazados por genes foráneos sin afectar su proliferación en el huésped. Los cinco virus recombinantes son vectores virales que codifican por una proteína del VPPA bajo la influencia de un promotor distinto.

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

- a. ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese:

No.

- b. ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese:

No.

- c. ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el ser humano, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar:

No.

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

No.

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

No aplica.

- f. Marcadores específicos del OMG:

Cada virus recombinante codifica por una proteína del VPPA, que puede ser distinguible por PCR o anticuerpos contra esa proteína específica.

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

Estable a largo plazo, confirmado por secuenciación completa utilizando NGS .

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

No.

### 5. Descripción de métodos de identificación y aislamiento planificados:

- a. Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:



Secuenciación completa. Inmunomarcaje con anticuerpos específicos para las proteínas codificadas en cada vector viral.

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

Los virus recombinantes se usarán únicamente en las instalaciones de alta seguridad biológica del IRTA-CReSA por lo que no habrá liberación en el medio ambiente.



## VI. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

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

La peste porcina africana (PPA) representa hoy en día la mayor amenaza para la industria porcina en todo el mundo. No hay vacuna ni tratamiento contra el virus de la PPA (VPPA), y actualmente la única forma de luchar contra la enfermedad es el sacrificio de los animales afectados y de los que se encuentran dentro del perímetro del foco de la infección, medidas cuestionables desde el punto de visto tanto ético como económico. Así pues, la necesidad de obtener una vacuna frente a la PPA es máxima. Además, el desarrollo de vacunas de subunidades frente a la PPA será esencial para su uso en zonas libres de la enfermedad, donde la implementación de vacunas vivas atenuadas puede ser complicada por asuntos de bioseguridad. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han permitido identificar varias proteínas del VPPA que son ampliamente reconocidas por animales supervivientes a la PPA (inmunizados con un prototipo vacunal disponible en el laboratorio que consiste en un virus atenuado), y por tanto son buenos candidatos para su incorporación en vacunas de subunidades contra el VPPA. No obstante, no solo la identificación de antígenos es importante, sino que la forma de presentarlos es también clave para el éxito de la formulación vacunal.

Con el fin de utilizar el vector más adecuado, nuestro colaborador industrial nos ha proporcionado con su tecnología basada en el uso del virus recombinante como vector viral. El virus recombinante es ampliamente utilizado como vector viral vivo experimental para la expresión de genes foráneos, ya que codifica por varios genes no esenciales que pueden ser reemplazados por genes foráneos sin afectar su proliferación en el huésped. VV-VPPAp1g1, VV-VPPAp2g1, VV-VPPAp1g2, VV-VPPAp2g2, and VV-VPPAg3 son vectores virales codificando cada uno para un gen del VPPA. Su utilización en nuestras instalaciones de alta seguridad biológica del IRTA-CReSA permitiría establecer su seguridad y eficacia para ser utilizados en formulaciones vacunales frente al VPPA. Se planea realizar un experimento en el que se inocularán 3 grupos de 5 cerdos domésticos con combinaciones de los vectores virales codificando por proteínas del VPPA. En cada grupo, habrá otro cerdo inoculado con el esqueleto de los vectores virales (el vector viral sin gene foráneo) como control negativo del experimento. Cada dosis de vector viral recombinante será de  $>10^{6,0}$  TCID<sub>50</sub> en 0.5mL. Para mejorar la respuesta inducida, se inocularán 2 dosis de los vectores virales en un intervalo de 3 semanas. Tres semanas tras la segunda dosis, los animales recibirán un desafío letal con VPPA para evaluar la capacidad protectora de los vectores virales recombinantes codificando por proteínas del VPPA.

Durante el experimento se obtendrán muestras de suero, sangre e hisopos nasales para poder medir la respuesta inmune generada por los vectores virales recombinantes y evaluar la protección conferida siguiendo protocolos establecidos en el laboratorio.

Todos los experimentos se realizarán en las instalaciones de alta biocontención (nivel de bioseguridad 3) del CReSA una vez aprobados por los comités de experimentación animal (IRTA y Generalitat) y el Comité de Bioseguridad del IRTA.

2. Información sobre el volumen o cantidad de OMG a utilizar:
  - a. Volumen o concentración máxima por ensayo en el caso de microorganismos.

- i) Para preparación de lotes

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



Se plantea realizar un experimento en el que se inocularán cerdos domésticos con combinaciones de los virus recombinantes codificando por proteínas del VPPA. Un cerdo extra por grupo se inoculará con el vector viral vacío para servir como control negativo del experimento. Cada dosis consistirá en  $>10^{6.0}$  dosis infectantes cincuenta (TCID<sub>50</sub>) en 0.5ml para cada virus recombinante. Para mejorar la respuesta inducida, se inocularán 2 dosis de los vectores virales en un intervalo de 3 semanas.

Por lo tanto, el volumen máximo de cada virus recombinante será de 2ml y una concentración de  $2 \times >10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml.

b. Número aproximado de plantas por ensayo:

No aplica.

c. Número aproximado de animales por ensayo:

33 cerdos domésticos de 4-5 semanas de edad a la llegada. Los OMG se inocularán en 18 de ellos.

3. Naturaleza de las operaciones:

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

4. Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

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

Teniendo en cuenta entre 1 y 2 semanas de aclimatación para los animales y la duración del experimento, se plantea realizar la actividad *in vivo* e *in vitro* con los PRV recombinantes en el período septiembre-diciembre de 2023.

Todos los experimentos se realizarán en las instalaciones de alta seguridad del CReSA una vez aprobados por los comités de experimentación animal (IRTA y Generalitat), el comité de Bioseguridad del IRTA y la Comisión Nacional de Bioseguridad.

## VII. EVALUACIÓN DE RIESGO

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

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

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

a. Organismo receptor.



El vector viral tiene licencia como vacuna por nuestro colaborador industrial. Ciertas regiones del genoma del vector viral fueron delecionadas debido a países seriados. Además, el virus tiene completamente delecionados los genes codificando para una glicoproteína y otra región corta única, lo que hace que el virus sea atenuado en el cerdo.

**b. Organismo donante.**

El organismo donante es el virus de la peste porcina africana (VPPA), cepa Georgia 2007/1. El VPPA afecta a cerdos domésticos y jabalíes, causando una patología caracterizada por una hemorragia interna generalizada que puede provocar mortalidades del 100% en cepas altamente virulentas. Un cerdo o un jabalí infectado muere en apenas 1-2 semanas. La obtención del plásmido de transferencia codificando para cada gen del VPPA se hizo por síntesis *in vitro*, por lo que no se manipuló en ningún momento el virus *wild-type*.

**c. Inserto.**

La estructura de los insertos es: promotor – gen de interés VPPA – secuencia polyA – Pause site. Los genes de interés son 3 y provienen del VPPA. El VPPA es un virus altamente complejo que codifica por más de 150 proteínas, una sola proteína no puede causar la enfermedad. No constan propiedades nocivas provenientes de la expresión de estos genes ni de las otras estructuras reguladoras que contiene el inserto.

**d. Vector.**

El vector de transferencia utilizado fue el plásmido pUC57 (Documento adjunto “Supplementary figures”, figura 4). Este vector no contiene ningún elemento regulatorio para eucariotas conocido. En el sitio de clonación múltiple del vector se clonó: Región 5’ flanqueante-promotor -Gen de interés-secuencia polyA-sitio de pausa transcripcional-Región 3’ flanqueante. Las secuencias nucleotídicas de los insertos del VPPA fueron sintetizadas en base a secuencias públicas en la base de datos del NCBI (GenBank accession number: FR682468.2, Georgia 07 strain).

**2. Identificar las posibles propiedades nocivas del OMG<sup>5</sup>**

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

No se esperan interacciones con otros organismos.

**b. Efectos para el medio ambiente.**

No se esperan interacciones con el medio ambiente. Los experimentos se realizarán en instalaciones de bioseguridad de nivel 3, con lo que no se liberará al medio ambiente en ningún momento.

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

Las características de la actividad son un uso confinado del OMG para inoculación en animales de experimentación (cerdos), y obtención de muestras para evaluar la respuesta inmune frente al mismo y su capacidad de conferir protección frente a un aislado virulento de VPPA.

El confinamiento será el típico de una unidad de Alta Biocontención de grandes animales (con duchas obligatorias de salida, filtración absoluta del aire, descontaminación química de los efluentes y eliminación de las carcasas infectadas por digestión alcalina o incineración). Todas estas barreras

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



de confinamiento y control garantizan su no diseminación al exterior, por tanto, nulo impacto ambiental. Todos los residuos generados serán objeto de recogida por gestores autorizados.

En los que respecta a la exposición humana, el patógeno animal es exclusivo de la especie porcina y no supone ningún riesgo para el hombre, pero el personal en los boxes experimentales trabajará con guantes y mascarilla quirúrgica y en laboratorio todas las muestras se procesarán con los EPIs habituales y dentro de cabina de seguridad biológica.

A la escala utilizada ni siquiera supondrá sufrimiento para los animales inoculados, mientras que el virus salvaje es letal a la misma dosis. El virus se crece en línea celular porcina *in vitro*. En cualquier caso, no se prevé tener que amplificar los stocks en el laboratorio

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

A pesar de que se esté planteando su uso en campo en zonas de riesgo de infección con PPA; el OMG objeto de estudio ha sido categorizado como grupo de peligrosidad 3 por el responsable de bioseguridad de IRTA-CReSA. Por tanto, las medidas a emplear serán las mismas que se utilizan para trabajar con el virus parental virulento, un agente de grupo de peligrosidad 3 y de declaración obligatoria a la OIE. Con este virus silvestre, sin modificar, el grupo solicitante lleva más de 20 años trabajando (los 10 últimos en IRTA-CReSA), incluso prestando apoyo a las administraciones públicas para su prevención y control, y siempre aprovechando las condiciones de alta seguridad biológica del CReSA.

## **VIII. DESCRIPCIÓN DE LAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN Y CONTROL ADOPTADAS DURANTE LA UTILIZACIÓN CONFINADA<sup>6</sup>**

1. Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

El Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) está certificado en Buenas Prácticas de Laboratorio por la Generalitat de Catalunya (Departament de Salut) desde el año 2009, con diversas renovaciones. El certificado actual tiene la referencia BPL/2001/001/CAT (17/gener/2020).

2. Formación del personal adscrito:

El personal experimental adscrito tiene experiencia probada desde hace muchos años en el manejo de infecciones experimentales con VPPA. El personal al cargo de las instalaciones y el cuidado de los animales tiene experiencia equivalente. El personal tiene a disposición formaciones internas semestrales de bioseguridad, biocontención, uso de equipos críticos y equipos de protección individual. La mayoría de ellos son doctores en veterinaria o biología y el personal al cuidado de los animales dispone de la preceptiva autorización.

3. Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Aplicación de una desinfección de bancadas, superficies de trabajo e interior de cabinas de seguridad biológica, con diluciones 1/10 de lejía doméstica fresco, preparado en el día, con una concentración de cloro libre de 4.000-5.000 ppm, por tiempo de contacto 5-10 minutos y posterior retirada por aplicación de nebulización de una solución de etanol al 70%. Otros desinfectantes

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





obligatoriamente autorización al responsable de la Unidad de Alta Biocontención o persona delegada, para proceder al vaciado del tanque.

Doble filtración mediante filtros HEPA de todo el aire que hay en la Unidad de Alta Biocontención (NBS3). Filtro HEPA absoluto a la salida de cada box experimental donde se mantienen los animales o bien en la sala de necropsias y batería de filtración de 10 filtros HEPA absolutos previamente a la salida hacia el exterior lo que supone una doble filtración absoluta de todo aire que se encuentra dentro de la Unidad de Alta Biocontención.

En cuanto a los residuos citostáticos (agentes mutagénicos, intercalantes, caotrópicos, etc.) como pueden ser soluciones con bromuro de etidio, tampones de lisis y lavado de kits de extracción de ácidos nucleicos, etc., estos se descartan en bidones por residuos de tipo IV que son cerrados herméticamente y recogidos por gestor de transporte de residuos autorizado.

b. Gestión por una empresa externa: SÍ  NO

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

PREZERO

## X. PREVENCIÓN DE ACCIDENTES DE LA ACTIVIDAD NOTIFICADA

1. Condiciones en las que podría producirse un accidente:

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

2. Equipamiento de seguridad (especifíquese):

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

3. Descripción de la información y formación suministrada a los trabajadores:

Procedimientos normalizados de trabajo de aparatos (CSB, centrifugas, autoclaves, etc.) y salas; normas de actuación en caso de derrames en cabinas de seguridad biológica, superficies y accidentes en centrifugas.

4. Planes de emergencia y contingencia:

Hay un plan de emergencia aprobado a disposición del personal.