



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

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

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

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Esther Esteban Rodrigo
NIF: 05271582M
Cargo: Directora del INIA
Tel: 913473900
Fax:
Correo electrónico: esther.esteban@inia.csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Alejandro Brun Torres
NIF: 02855574D
Cargo: Investigador Científico
Tel: 916202300
Fax: 916202247
Correo electrónico: brun@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: 916202300
Fax: 916202247
Correo electrónico: laura.perez@inia.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: Proyectos de generación de conocimiento 2021.
- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: PID2021-122567OB-I00. Alejandro Brun/Belén Borrego
- Organismo financiador: Agencia Estatal de Investigación

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

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

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Finalidad de la actividad:

El desarrollo de métodos de genética inversa para el virus de la fiebre del Rift (RVFV) ha facilitado la manipulación de su genoma y la generación de mutantes de delección altamente atenuados in vivo. Por otra parte, la generación de variantes víricas del aislado 56/74 tras pases seriados en presencia de drogas mutagénicas permitió identificar una variante denominada 40Fp8 que posee al menos 47 mutaciones implicadas en una profunda atenuación del virus. Debido al tropismo del RVFV por células dendríticas y macrófagos (células esenciales en presentación antigénica) este virus posee unas condiciones ideales como posible vector vacunal y que merecen ser exploradas en mayor detalle. Por ello nos interesa la evaluación del potencial de los virus 56/74 y 40Fp8 como vectores de expresión de antígenos heterólogos. En este contexto pretendemos evaluar esta capacidad mediante la inserción, en ambos virus, de genes de antígenos vacunales de otros patógenos importantes de los animales rumiantes. En el caso de esta solicitud se generarán virus recombinantes de la fiebre del Valle de Rift (rRVFV 56/74 y 40Fp8) atenuados (por delección del gen NSs) que expresan antígenos del virus del

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.



síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV), un coronavirus (fam. *Coronaviridae*) cuya especie animal reservorio son los dromedarios, los cuales pueden transmitir el virus al ser humano causando infecciones mortales. Se pretende comprobar la viabilidad de virus recombinantes que expresen antígenos de MERS-CoV, la proteína de la envuelta S (Spike) estabilizada en un estado prefusión (S0) o fragmentos de la misma que contengan el sitio de unión al receptor celular (RBD) responsable de la unión del virus en las células huésped. Para ello se intentará el rescate de virus recombinantes mediante el empleo de técnicas de genética reversa. Con los posibles recombinantes obtenidos se realizarán ensayos fenotípicos (tasa de crecimiento en cultivo, estabilidad genética y antigénica, nivel de expresión etc) y se comprobará la capacidad de estos virus para inducir respuestas inmunitarias específicas de los antígenos recombinantes.

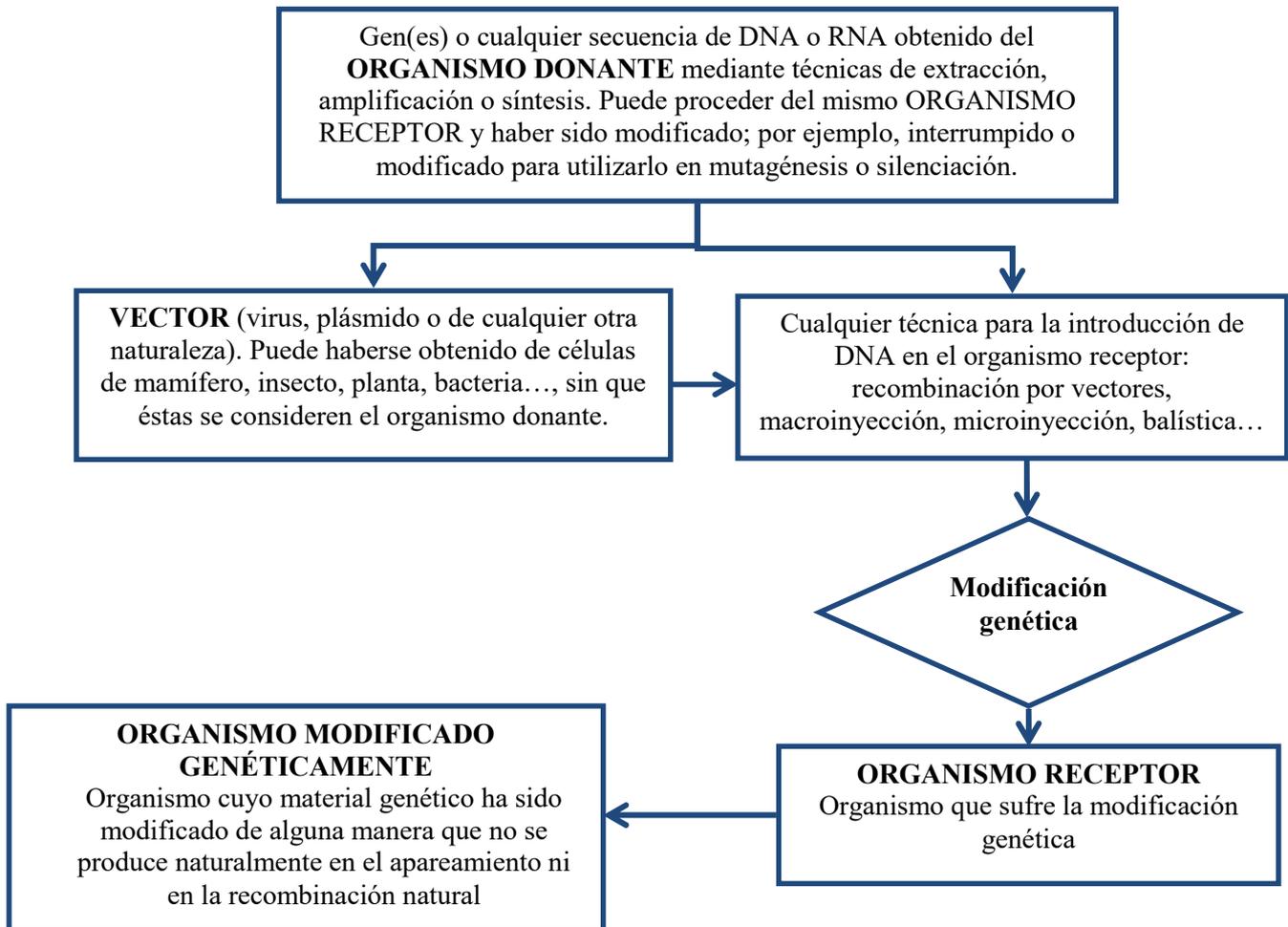
2) Clasificación de la actividad:

(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: RVFV-56/74 y variante mutagenizada 40Fp8

Taxonomía: *O. Bunyvirales*, *F. Phenuiviridae*, *G. Phlebovirus*

Nombre común: virus de la fiebre del Valle del Rift

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

- a) Técnicas de aislamiento: rescate mediante clon infeccioso en cultivos de líneas celulares estables (BHK21, HEK293 y VERO)
- b) Técnicas de identificación: secuenciación, RT-PCR, Western blot, ELISA
- c) Marcadores genéticos: (ver tabla I)
- d) Marcadores fenotípicos: (ver tabla I)

Tabla I. Cambios genéticos y fenotípicos de la variante 40Fp8 con respecto al virus parental 56/74

(Borrego y Brun *Frontiers in Microbiology* 2021)

RNA Segment	Protein/region ^a	Nucleotide position changed ^b	Nucleotide (codon) changed 56/74 → 40Fp8	Amino acid position ^b	Amino acid substitution ^c
L	5'end N-term	198	GGC → GGT	60	(Gly)
		317	ATG → ACG	100	Met → Thr
		396	TTC → TTT	126	(Phe)
		1120	CTA → TTA	368	(Leu)
		1141	CAC → TAC	375	His → Tyr
	RdRp core	2757	CTA → TTA	913	(His)
		2788	GGT → AGT	924	Gly → Ser
		3166	ATT → GTT	1050	Ile → Val
	3'end C-term	3925	GCC → ACC	1303	Ala → Thr
		4110	CTG → CTA	1364	(Leu)
		4903	CTC → TTC	1629	Leu → Phe
		4992	AAG → AAA	1658	(Lys)
		5025	GTG → GTA	1669	(Val)



		5178	AAG→AAA	1720	(Lys)
		5193	AAA→AAG	1725	(Lys)
		5229	TTC→TTT	1737	(Phe)
		6229	GAG→AAG	2071	Glu→Lys
Total number of changes (L)		17		7	
M	NSm	97	AGA→AAA	26	Arg → Lys
		342	CAC→TAC	108	His → Tyr
		372	GAG→AAA	118	Glu→Lys
		374			
	Gn	649 (mixed) ^d	AGA→AAA	210	Arg → Lys
		716	CAG→CAA	232	(Gln)
		1017	GAT→AAT	333	Asp→Asn
		1299	GCT→ACT	427	Ala→Thr
		1315	GCC→GTC	432	Ala → Val
		1337	GGT→GGA	439	(Gly)
		1480	GAG→GGG	487	Glu → Gly
		1638	CAC→TAC	540	His → Tyr
		1742	CTG→CTA	574	(Leu)
		1764	GCT→ACT	582	Ala→Thr
		1779	GTT→ATT	587	Val → Ile
		Gc	2324	AGC→AGT	768
	2869		GCA→GTA	950	Ala → Val
	3288		GTA→ATA	1090	Val → Ile
	3359		ACC→ACT	1113	(Thr)
	3367		GCT→GTT	1116	Ala → Val
	3565		AGA→AAA	1182	Arg → Lys
	3'NCR	3821	A→G	---	---
		3823	T→A	---	---
Total number of changes (M)		23		15	
S	NSs	124	AGG→AGA	30	(Arg)



		188	GTT→ATT	52	Val → Ile
		279	CCA→CTA	82	Pro → Leu
		598	GAG→GAA	188	(Glu)
	Intergenic región	887	C→T	---	---
	NP	952	GTC→GTT	234	(Val)
		1645	AAC→AAT	3	(Asn)
Total number of changes (S)		7		2	
TOTAL		47		24	

^a Definition of regions within the RNA segments. ^b Amino acid and nucleotide numbering according to the sequence of RVFV SA75, accession #: DQ375428 (segment L); DQ380189 (segment M) and DQ380175 (segment S). ^c Amino acids are represented with the 3-letter code; when the nucleotide change did not lead to an amino acid substitution (silent mutation) the corresponding residue is written between parentheses. ^d Even though position 649 in the M-segment was found to show traces of the parental nucleotide (mixed) this position was computed as amino acid changed.

- e) Estabilidad genética: El virus 56/74 se puede mantener genéticamente estable en cultivos celulares seriados alternos de células de mamífero y de insecto para evitar las delecciones que se observan si se propaga únicamente en células de mamífero, tal y como se ha descrito por Moutailler S, et al (*Host alternation is necessary to maintain the genome stability of Rift Valley fever virus*. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5(5):e1156). La variante 40Fp8 es estable en cultivos de células Vero al menos durante diez pases seriados (B. Borrego, *datos no publicados*)
- 3) Posibles modificaciones genéticas anteriores: ninguna, al generarse ambos a partir de un clon infectivo de cDNAs con una secuencia determinada.
- 4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?
- | | | | | |
|----------------|----|-------------------------------------|----|-------------------------------------|
| Virus 56/74 | SI | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| Variante 40Fp8 | SI | <input type="checkbox"/> | NO | <input checked="" type="checkbox"/> |
- 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: El virus 56/74 vivo se considera patógeno en los rumiantes domésticos y en el ser humano.
- 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.): Grupo de riesgo 3

- a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad? En el hombre: fiebre, dolor muscular, fatiga, náuseas, vómitos, ictericia, elevación niveles enzimas hepáticas. En algunos casos problemas oculares (retinitis), meningitis y shock hemorrágico. En animales: fiebre limitada, abortos en ruminantes gestantes, incluidos camélidos. En animales neonatos sobreviene muerte en 1-2 días.
- b) En el caso de cepas no virulentas de especies patógenas: ¿es posible excluir la reversión a la patogenicidad?

SI NO

Porqué: El genoma del virus es un ssRNA(-) trisegmentado. Teóricamente sería posible un intercambio entre segmentos genómicos de dos virus relacionados pero no hay evidencia de que este tipo de reordenamientos haya ocurrido entre un virus atenuado y uno silvestre en la naturaleza, dentro del grupo de los phlebovirus o, incluso, durante el uso en campo de vacunas RVF vivas atenuadas. De ocurrir, lo más probable es que no tuviera consecuencias no deseadas tal y como ha sido discutido por Monath T.P et al., (*Theoretical risk of genetic reassortment should not impede development of live, attenuated Rift Valley fever (RVF) vaccines commentary on the draft WHO RVF Target Product Profile*. Vaccine X. 2020;5:100060. Epub 2020/04/28.

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

Si, al ser un virus rescatado a partir de cDNA clonado y expandido en cultivos libres de bacterias y de micoplasmas.

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

Nuestra experiencia se inicia en el año 2006, cuando se importaron por primera vez en España cepas del virus de la FVR procedentes de Sudáfrica. Desde entonces llevamos aplicando protocolos específicos para la manipulación del virus en confinamiento BSL-3 y 3+, así como medidas específicas de desinfección de cabinas, laboratorios e instalaciones de animalario. En concreto nuestra experiencia con el aislado receptor 56/74 es muy amplia al llevar a cabo experimentos de infección en modelos animales de laboratorio y en ovinos siempre en entorno de bioseguridad BSL-3, habiendo publicado numerosos estudios científicos con este aislado. En cuanto a la variante hiperatenuada 40Fp8 nuestra experiencia es más reciente a partir del año 2018 cuando se obtiene esta variante por mutagénesis química. Los detalles sobre su caracterización se han descrito en Borrego B, y Brun A. (*A Hyper-Attenuated Variant of Rift Valley Fever Virus Generated by a Mutagenic Drug (Favipiravir) Unveils Potential Virulence Markers*. *Front Microbiol.* 2020;11:621463. Epub 2021/02/27. doi: 10.3389/fmicb.2020.621463).

- 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?:

Posible para el virus 56/74. Se desconoce para la variante 40Fp8

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: para el virus 56/74, por homología con lo descrito para los virus de la FVR sería posible suponer su capacidad de persistencia en los huevos de mosquitos infectados en diapausa (se desconoce si la variante hiper-atenuada 40Fp8 podría persistir de este modo).

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

Para ambos organismos: temperatura, radiación UV-C, humedad relativa, exposición a agentes químicos. La variante 40Fp8 podría ser un mutante termosensible en cultivos celulares (no crecimiento permisivas a temperaturas superiores 39°C) aunque no se ha comprobado experimentalmente

- d) Posibles nichos ecológicos: Para el virus 56/74: zonas endémicas mosquitos, pequeños roedores, quirópteros o ungulados de vida silvestre (no domésticos). Se desconoce para la variante 40Fp8 pero sería muy poco probable una persistencia en un nicho natural considerando su carácter hiperatenuado.
- e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: Para los aislados naturales, dependiendo de las condiciones ecológicas y de hábitat se han determinado diferentes tiempos de generación de brotes epizooticos de la enfermedad. Zonas húmedas tropicales: circulación permanente criptica, humedales y zonas de vegetación arbustiva (incluyendo sabana africana y pastizales): cada 5-10 años; zonas áridas y desérticas: cada 15-30 años.

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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



- b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos: Para 56/74 infecciones en animales domésticos y ser humano causando posible patología. La variante 40Fp8 es apatogénica en animales de laboratorio y en ovinos.

11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor: El aislado 56/74 procede de un brote epizootico de la enfermedad en Sudáfrica en 1974. La variante 40Fp8 es un virus obtenido en el laboratorio.

12) Hábitat natural del organismo: Probablemente el virus 56/74 podría circular en especies de mosquitos de bosque tropical africano. La variante 40Fp8 no tiene hábitat natural.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: *virus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV)*

Taxonomía: *O. Nidovirales, Fam. Coronaviridae, Gen. Betacoronavirus*

Nombre común: coronavirus *MERS*

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: DNA

3) Método de obtención:

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

4) Función del gen/genes en el organismo donante: El gen de la proteína S (Spike) codifica la glicoproteína de la envuelta del virus responsable de la unión y entrada del virus en las células huésped. La proteína S media la interacción inicial con receptores celulares de membrana que mediante proteólisis sufre un cambio conformacional capaz de fusionar la membrana viral y celular para la liberación intracelular de la ribonucleocápside del virus.

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

SI NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

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

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?



La presentación más común de una infección por MERS-CoV es la fiebre, tos y dificultades respiratorias. La neumonía puede ser habitual aunque no siempre tiene lugar. Pueden darse también síntomas gastrointestinales que incluyen la diarrea. En los casos más graves se produce el fallo respiratorio que requiere un tratamiento de soporte en UCI mediante el empleo de ventilación por respiradores mecánicos. La infección por el virus puede acarrear un cuadro grave en personas mayores o en aquellas con enfermedades crónicas de tipo renal o respiratorio así como cáncer o diabetes.

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

Sí. La glicoproteína S es responsable del tropismo del virus por las células diana. En concreto estas pueden ser células de la mucosa respiratoria o intestinal donde la replicación primaria del virus tiene lugar.

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

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

- 1) Tipo de modificación genética:

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

- 2) Finalidad de la modificación genética:

Generar un virus RVFV recombinante (rRVFV) que exprese secuencias potencialmente inmunorelevantes (con capacidad estimuladora del sistema inmunitario) del coronavirus MERS. Comprobar si es posible su expresión y en caso afirmativo la inducción de una respuesta inmunitaria específica in vivo para apoyar el uso del rRVFV como una alternativa para la inmunización de dromedarios o camélidos susceptibles a MERS-CoV. Puesto que los dromedarios y camellos son además especies susceptibles a la infección por RVFV, el virus obtenido podría constituir una vacuna viva atenuada para prevenir la fiebre del Valle del Rift y la infección por MERS-CoV en camellos. Los animales quedarían protegidos frente a la RVF y no serían transmisores del MERS-CoV al ser humano.

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

El genoma de RVFV 56/74 y de la variante 40Fp8 será sintetizado de novo por una compañía biotecnológica (eg. Biomatik o GenScript), y cDNA de cada gen/segmento viral (L, M y S) será clonado en un plásmido tipo pBluescript pBSK(+) y flanqueado por el promotor de la RNA

polimerasa T7 en el extremo 5' y por la ribozima del virus de la hepatitis delta y el terminador de la polimerasa T7 en el extremo 3'. Un segmento S modificado de ambos virus se sintetizará y clonará en pBSK(+) sin la secuencia del gen de virulencia NSs, incluyendo en su sitios de restricción (BslI y Sall) que permita la inserción de antígenos heterólogos (en este caso genes o fragmentos de genes del virus MERS-CoV). En resumen, para cada secuencia de virus se generarán 4 plásmidos que contendrán las secuencias específicas de cada segmento de RNA vírico L, M, S, y S[ΔNSs]

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a) Tipo e identidad del vector: Plásmido pBSK(+)

b) Si se trata de un virus:

Es defectivo en replicación SÍ NO

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

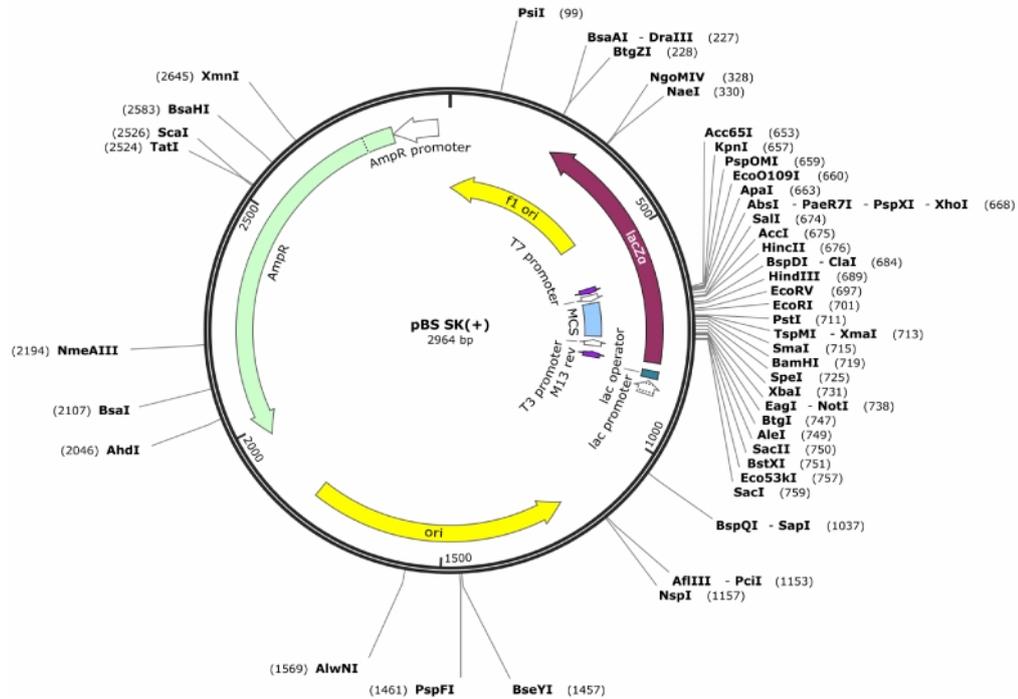
Plásmido pBSK+ para inserción de las distintas secuencias genómicas de RVFV. El plásmido se ha modificado para flanquear el segmento viral con un promotor para la polimerasa T7 en el extremo 5' y la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta y un terminador de la polimerasa T7 en el extremo 3' tal y como se indica en la figura. El plásmido porta un gen de resistencia a antibiótico para la selección de colonias de bacterias transformadas.



TAATACGACTCACTATA-Segmento RVFV L, M o S
GGCCGCATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATTCCGAGGGGACC
GTCCCCTCGGTAATGGCGAATGGGACCTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGT
CTTGAGGGGTTTTTTG



Created with SnapGene®



d) Gama de hospedadores del vector: Bacterias *E.coli* competentes tipo JM109

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?

iii) ¿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 al organismo receptor (RVFV), y solo se utilizan para la propagación del plásmido en cultivos de bacterias.

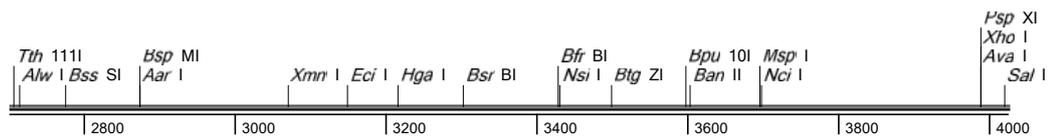
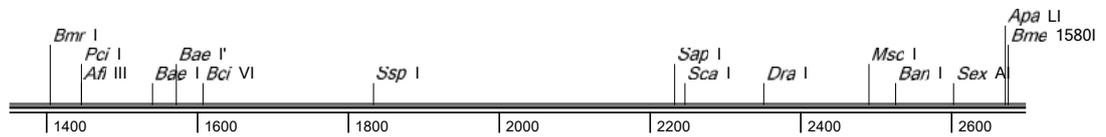
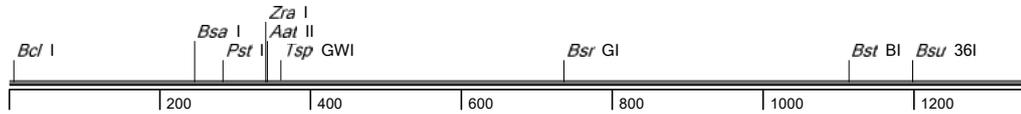
4) Información del inserto:

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

Dimensiones inserto **MERS-CoV Spike protein gene S0**: 4062 bp

(strain Jordan1_2015, GeneBank accesion number: KU233364)

Mapa de restricción inserto (sitios de corte únicos):



Secuencia inserto S0 (S-2P variant V1060P L1061P)

```
CTTAAGTGATCACCACCatgatacactc agtgttttcta ctgatgttct tgttaacacc tacagaaagt
tacgttgatg tagggccaga ttctgttaag tctgcttcta ttgaggttga tatacaacag
actttctttg ataaaacttg gcctaggcca attgatgttt ctaaggctga cggattata
taccctcaag gccgtacata ttctaacata actatcactt atcaaggctt ttttcctat
cagggagacc atggtgatat gtatgtctac tctgcaggac atgctacagg cacaactcca
caaaagtgtt ttgtagctaa ctattctcag gacgtcaaac agtttgctaa tgggtttgtc
gtccgtatag gacagctgc caattccact ggcactgcta ttattagccc atctaccagc
gctactatac gaaaaattta cctgtctttt atgctggggtt cttcagttgg taatttctca
```



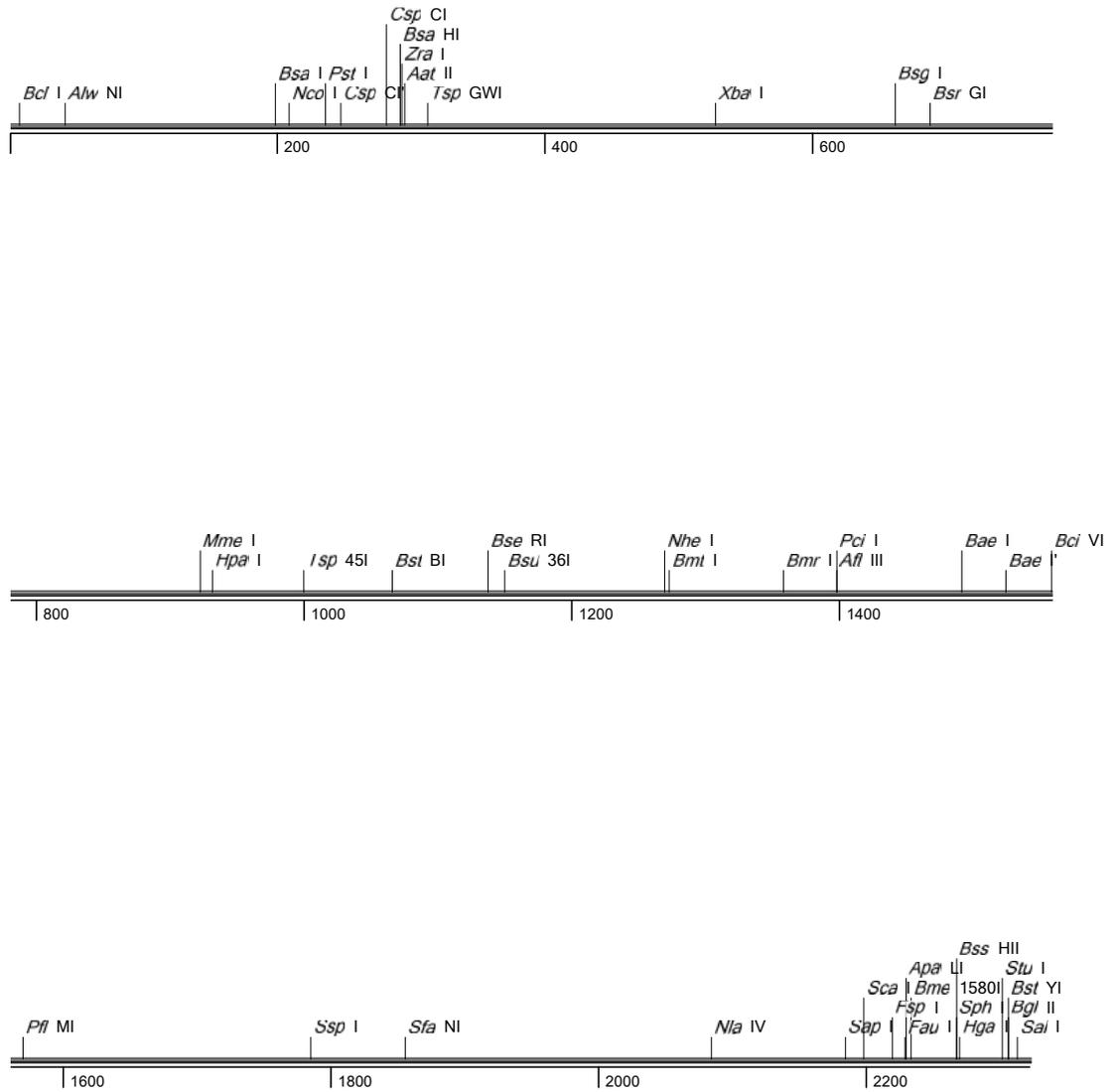
gatggtaaaa tgggcccgtt cttcaatcat actctagttc ttttgcccga tggatgtggc
actttactta gagcttttta ttgtatttcta gagcctcgcg ctggaaatca ttgtcctgct
ggcaattcct atacttcttt tgccacttat cacactcctg caacagattg ttctgatggc
aattacaatc gtaatgccag tctgaactct ttttaaggagt attttaattt acgtaactgc
acctttatgt acacttataa cattaccgaa gatgagattt tagagtgggt tggcattaca
caaaactgctc aaggtgttca cctcttctca tctcgggatg ttgatttgta cggcggcaat
atgtttcaat ttgccacctt gcctgtttat gatactatta agtattattc tatcattcct
cacagtattc gttctatcca aagtgataga aaagcttggg ctgccttcta cgtatataaa
cttcaaccgt taactttcct gttggatttt tctgttgatg gttatatagc cagagctata
gactgtgggt ttaatgattt gtcacaactc cactgctcat atgaatcctt cgatgttgaa
tctggagttt attcagtttc gtctttcga gcaaaacctt ctggctcagt tgtggaacag
gctgaagggt ttgaatgtga tttttcacct cttctgtctg gcacacctc tcaggtttat
aatttcaagc gtttggtttt taccaattgc aattataatc ttaccaaatt gctttcactt
ttttctgtga atgattttac ttgtagtcaa atatctccag cagcaattgc tagcaactgt
tattcttcac tgatttttga ttatttttca taccactta gtatgaaatc cgatctcagt
gttagttctg ctggccaat atocccagttt aattataaac agtctcttcc taatcccaca
tgtttgattt tagcgaactg tctcataka cttactacta ttactaagcc tcttaagtac
agctatatta acaagtgcct tcgtcttctt tctgatgatc gtactgaagt acctcagtta
gtgaacgcta atcaatactc accctgtgta tccattgtcc catccactgt gtggaagac
ggtagattatt ataggaaca actatctcca cttgaagggt gtggctgggt tgttctagt
ggctcaactg ttgccatgac tgagcaatta cagatgggct ttggattac agttcaatat
ggtacagaca ccaatagtgt ttgcccgaag cttgaatttg ctaatgacac aaaaattgcc
tctcaattag gcaattgcgt ggaatattcc ctctatgggt tttcgggccc tgggttttt
cagaattgca cagctgtagg tgttcgacag cagcgctttg tttatgatg gtaccagaat
ttagttggct attattctga tgatggcaac tactactggt tgcgtgcttg tgttagtgtt
cctgtttctg tcatctatga taaagaaact aaaaccacg ctactctatt tggtagtgtt
gcagtgaac acatttctc taccatgtct caatactccc gttctacgg atcaatgctt
aaacggcgag attctacata tggctcccct cagacacctg ttggttgtgt cctaggactt
gttaattcct ctttgttctg agaggactgc aagttgcctc ttggtaact tctctgtgct
cttctcgaca caactagtac tctcacacct cgcagtgtgc gctctgttcc aggtgaaatg
cgcttggcat ccattgtctt taatcatcct attcagggtg atcaacttaa tagtagttat
tttaatttaa gtataacctac taatttttcc tttgggtgta ctcaggagta cattcagaca
accattcaga aagtactgt tgattgtaaa cagtagcttt gcaatggttt ccagaagtgt
gagcaattac tgcgcgagta tggccagttt tgttccaaaa taaccaggc tctccatggt
gccaatttac gccaggatga ttctgtacgt aatttgtttg cgagcgtgaa aagctctcaa
tcatctccta tcatacctac ttttggagg gactttaatt tgacacttct agaacctggt
tctatatcta ctggcagctg tagtgacagt agtgctattg aggatttgc tttgacaaa
gtcactatag ctgatcctgg ttatatgcaa ggttacgatg attgtatgca gcaaggcca
gcacagctc gtgatcttat ttgtgctcaa tatgtggctg gttataaagt attacctcct
cttatggatg ttaatatgga agccgcgtac acttcatctt tgcttggcag catagcaggt
gttggctgga ctgctggctt atcctccttt gctgctattc catttgcaca gagtattttt
tataggttaa acggtgttgg cattactcaa caggttcttt cagagaacca aaagcttatt
gccaataagt ttaatcaggc tctgggagct atgcaaacag gcttctactc aactaatgaa
gcttttcgga aggttcaggc tgctgtgaac aacaatgcac aggcctctac caaattagct
agcagctat ctaatacttt tgggtgctatt tccgcctcta ttggagacat catacaactg
ctttaggttc tcgaacagga cgcccaata gacagactta ttaatggccg tttgacaaca
ctaaatgctt ttgttgaca gcagcttgtt cgttccgaat cagctgctct tccgctcaa
ttggctaaag ataaagtcaa tgagtgtgct aaggcacaat ccaagcgttc tggattttgc
ggtcaaggca cacatatagt gtoccttgggt gtaaatgcc ctaatggcct ttactttatg
catgttgggt attaccctag caaccacatt gaggttgggt ctgcttatgg tctttgcat
gcagtaacc ctactaattg tatagcccct gttaatggct actttattaa aactaataac
actaggattg ttgatgagt gtcataact ggctcgtcct tctatgcacc tgagcccac
acctctcta atactaagta tggttgacca caggtgacat accaaaacat tctactaac
ctccctcctc ctcttctcgg caattccacc gggattgact tccaagatga gttggatgag
tttttcaaaa atgttagcac cagtatacct aattttgggt ctctaacaca gattaatact
acattactgc atcttacctc cgagatgttg tctctcaac aagttgttaa agccctaat
gagcttaca tagaccttaa agagcttggc aattataact attacaacaa atggcgtgg
ctgtgctgca ctggttgtgg cacaaactgt atgggaaac ttaagtgtaa tctgttgg
gatagatacg aggaatacga cctcgagccg cataaggttc atggttacta agtcgac



Dimensiones inserto **MERS-CoV Spike protein gene S1 fragment**: 2322 bp

(strain Jordan1_2015 GeneBank accesión number: KU233364)

Mapa de restricción inserto (sitios de corte únicos):





Secuencia inserto S1:

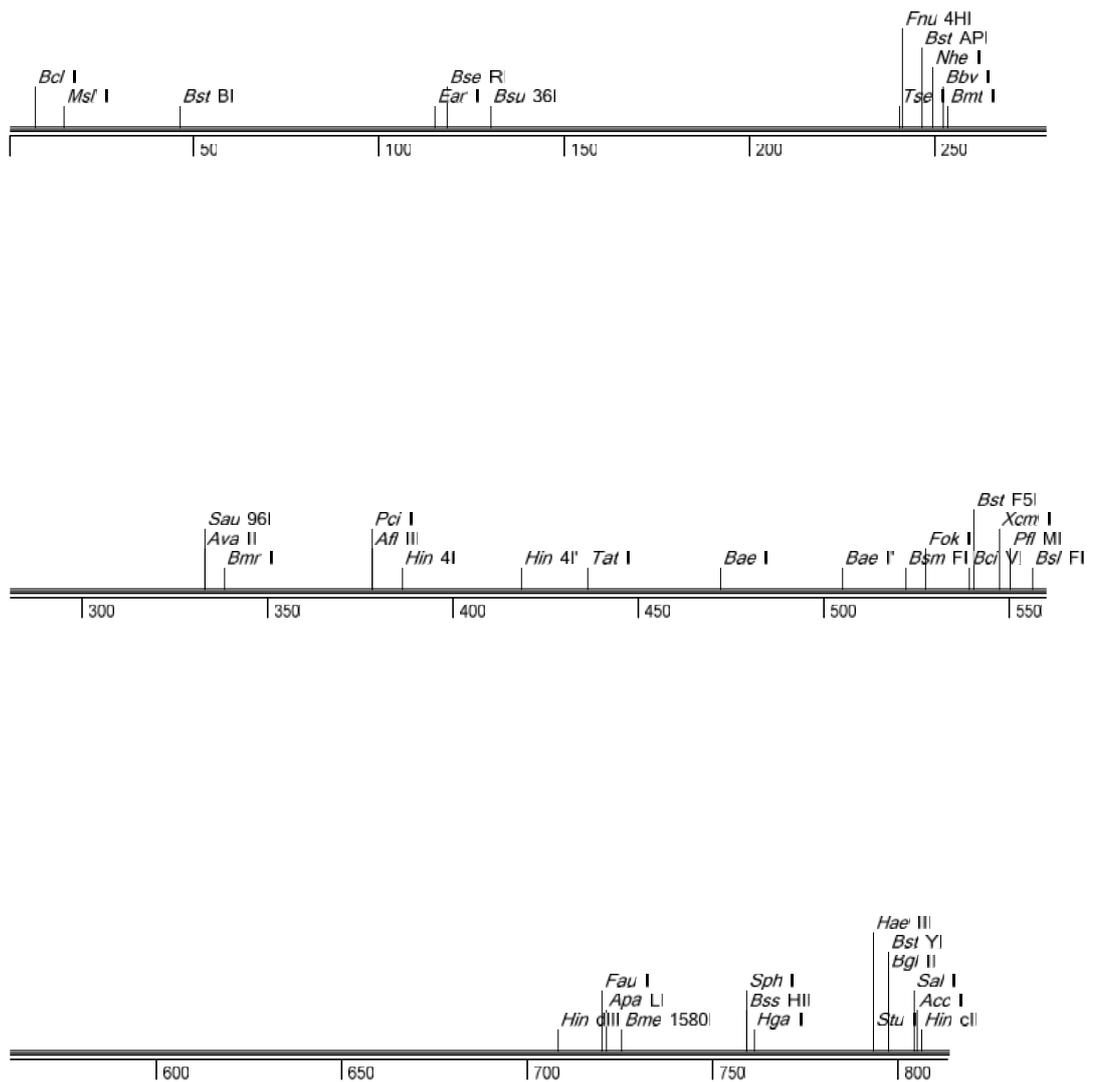
CTTAAGTGATCACCACCATGtacgttgatgtagggccagattctgttaagtctgcttgattgaggttgatatacaacagactttctttgat
aaaacttggcctagggccaattgatggttctaaggctgacggattatataccctcaaggccgtacatatctaacataactatcacttatca
aggtcttttccctatcagggagaccatgggtgatatgatgtctactctgcaggacatgctacaggcacaactccacaaaagtgtttgtag
ctaaactattctcaggacgtcaaacagtttgctaattgggttgcgtccgtataggagcagctgccaattccactggcactgttatttagc
ccatctaccagcgtactatacgaataattaccctgctttatgtcgggttcttcagttggtaatttctcagatggtaaaatgggcccgtt
cttcaatcactactagttctttgcccgatggatgtggcactttaacttagagctttttatgtattctagagcctcgtctggaaatcatt
gtcctgctggcaattcctatacttcttttgccacttatcacactcctgcaacagattggtctgatggcaattacaatcgtaatgccagctg
aactcttttaaggagtattttaatttacgtaactgcactttatgtacacttataacattaccgaagatgagattttagagtggtttggcat
tacacaaaactgctcaagggttcacctctctcatctcggtagttgatttgtacggcggaatagtttcaatttgccacctgacctggtt
atgatactattaagtattattctatcattcctcacagattcgttctatccaaagtgatagaaaagcttgggctgccttctacgtatataaa
cttcaaccgtaactttctggttgattttctggtgatggttataacgcagagctatagactgtggttttaatgattgtcacaactcca
ctgctcatatgaatccttcgatgttgaatctggagtttattcagttcgtctttcgaagcaaacctctggctcagttgggaacagagctg
aagggttgaaatgtagttttcacctctctgctcggcacactcctcaggtttataatttcaacgcttgggttttaaccaattgcaattat
aatcttaccaaattgctttcactttttctgtgaatgatttacttgtagtcaaatactccagcagcaattgctagcaactgttattcttc
actgattttggattattttccatacccacttagtatgaaatccgatctcagtgtagttctgctggccaatatacccagtttaataataaac
agtccttttctaatacccacatgtttgatttttagcgaactgttccctataacctactactattactaagcctcttaagtacagctatataac
aagtctctcgtcttctttctgatgatcgtactgaagtacctcagtttagtgaacgctaatacaatactcaccctgtgtatccattgtcccatc
cactgtgtgggaagacgggtgattatataagaaacaactatctccacttgaaggtgggctggcttgttgctagtggctcaactgttgcca
tgactgagcaattacagatgggctttggtattacagttcaataggtacagacaccaataggtttgcccgaagcttgaatttgctaatac
acaaaattgcctctcaattaggcaattgctggaatattccctctatgggtttcgggcccgtgggtttttcagaattgcacagctgtagg
tgttcgacagcagcgtttgtttatgatgcgtaccagaatttagttggctattatctgatgatggcaactactactgtttgctgcttgg
ttagtgttccctgttctgtcatctatgataaagaaactaaaacccagcctactctatttggtagtggatgtgaacacatttctctacc
atgtctcaatactcccgttctacgcgatcaatgcttaaacggcgagattctacataggtccccttcagacacctgttgggtgtgtcctagg
acttgttaattcctctttgttctgtagaggactgcaagttgcctcttgggtcaatctctctgtgctcttctgacacacctagtactctcacac
ctcgcagtgctgcaccgcccagtgcaacgctgggatttgggtcacctaacgcagcagcatgctgcgccatttgccaatacccaaccccctacta
ggcctagatCTCGTCGACCCGC



Dimensiones inserto **MERS-CoV Spike protein gene Receptor binding domain (RBD)**
fragment: 813 bp

(strain Jordan1_2015 GeneBank accesión number: KU233364)

Mapa de restricción inserto (sitios de corte únicos):





Secuencia inserto RBD:

CTTAAGTGATCACCACCatgtctggagtttattcagtttcgtctttcgaagcaaaaccttctggctcagttgtggaacaggctgaagtggtt
 gaatgtgattttcacctcttctgtctggcacacctcctcaggtttataatttcaagcgtttgggtttttaccaattgcaattataatcttac
 caaattgctttcactttttctgtgaatgattttactgttagtcaaatatctccagcagcaattgctagcaactgttattcttctcactgattt
 tggattatttttcaccacttagtatgaaatccgatctcagtggttagttctgctggtccaatatcccagtttaattataaacagtccttt
 tctaatacccacatgtttgatttttagcactgttctcacaacttactactattactaagcctcttaagtacagctatattaacaagtgtctc
 tegtcttcttctgtatgatcgtaactgaagtacctcagtttagtgaacgctaataactcaccctgtgtatccattgtcccatccactgtgt
 gggaagacggtgattattataggaacaactatctccacttgaagtggtggctggcttgtgtgctagtggtcactgttgccatgactgag
 caattacagatggccttgggtattacagttcaatatggtacagacaccaatagtgtttggcccaagcttaccgacagtgacgcggggattt
 ggctcacctaacgacgacgcatgctgcgcatatttgccaatacccaacccctactaggcctagatCTCGTCGACCCGC

- b) Información sobre la delección del gen NSs: En el cDNA clonado del Segmento S (1885 nts) se incluyen sitios de restricción **BclI** (N-term) y **Sall** (C-ter) para eliminar la secuencia NSs tal y como se indican en la figura en azul mientras que los cambios de nucleótido se han resaltado en rojo. Los códigos de colors corresponden a las secuencias **polimerasa T7** en el extremo 5' y la secuencia de la **ribosima** del virus de la hepatitis delta y un **terminador de la polimerasa T7**

TCGCGAGCGGCCGC

AGGGAAT**TAATACGACTCACTATA**

acacaaagctcCCTAGAGATACAAACACTATTACAATA**ATG**GACAACATCAAGAGCTTGGCATCCAGTTTGGCTGCTCAA
 GCAGTGGACCCGAATGAGATTGAACAGTGGGTCGAGAGTTTGCTTATCAAGGATTTGATGCCCCGATAGGGTTATCGAACT
 CTTAAAGCAGTATGGTGGGGCTGGCTGGGAGAAGGATGCCAAGAAAATGATTGTTCTGGCTCTGACTCGTGGCAACAAAGC
 CCCGGAGGATGATGATGAAAATGTCGAAAAGAAGGCAAAGCAACTGTGGAGGCTCTCATCAACAAGTATAAGCTAAAGGAG
 GGAATCCTTCCCGGGATGAGTTGACTCTATCACGAGTTGCTGCTGCCCTGGCTGGCTGGACTTGCAGGCTTTGGTTCGT
 CTTGAGTGAGTGGCTTCTGTCACTGGGACCACCATGGATGGCCATCCCCTGCATACCCAAGGCATATGATGCACCCCA
 GCTTTGCTGGCATGGTGGACCTTCTCTACCAGAAGACTATCTAAGGGCAATATTGGATGCTCACTCTCTGTATCTGCTG
 CAGTTCTCCCGGGTCATCAACCAAACTCCGAGGTAGAACAAGGAGGAGGTTGCCGCAACGTTACGCAGCCAATGAA
 TGCAGCAGTGAATAGCAACTTTATAAGCCATGAGAAGAGGAGAGAATTCTTGAAAGCTTTTGGGCTTGTGGATTCCAATG
 GgAAGCCGTCAGCAGCTGTCTAGGACGCTGCTCAGGCGTACAAGACAGCAGCC**TAA**GTGGCTGCCAGGGGTTTGGGGAA
 AAGGGGGTGGTTGGGGTTACGGTCGGGATTGGGGGTGGGGGTGGGGCAGCCTTAATCT**CTA**g**TCgAC**CTCAACAAATCC
 ATCGTCATCACTCTCTTCTCTGATTCTATCTCAACATCTGGGATTGGAGGAACAACCTGGAACCCAGTTGTTTCTCCCA
 TCATGCTAGGGAGTGATGAGCGCAGCATCAAGCTCTCCTCCATAAGAGCAATGAGAGCTGAGTTTGGAACTACAGCATT
 GAAATATCCTCTCTTGTGCTGCCTGCAGGAGCCGAACACACTGAACGTGAGCAACCTCATACATGAGATCAAAGCCTGGCAA
 CAGGCACAAGTCAATCCCTCTGAGGATAGCCTCGGTCACTATCATCCTGTGTAAGCAACAAGGAGTCCCTCCAGATCAT
 TGGTAATCTTGCAGCTCCTCATTGCTAGAGTAGCAATCTGGTCCCTTCTAATATCATCAGACCTATGCACTCTGGTGGAG
 CTTAGGTCAAAGAAAGCCAGGGAGGGTTCTCCAAGAGCCAGGATATGGCTTCTTTCAGATTGGGGAACCTTGTGAAATC
 ACTAAGAGTCATATGGCCTATTAGATCAATAAGTCTCTGAAAAGGCTTTGCTGGTGGAGGTGCAACGTTTGATACAAAGT
 CTCCAAGTCCGACTCGGTATGGGAATTCTCCGACATTGTAGAAATCAGAGAATCGCAAGCGAACCTCGTACTAGGACGA
 TGGTGCATGAGAAAGACACAACAGGGCCCAACCATAGAATAAGGTATCCTGGGAGGACCATCACCTCTAATGTACTCCAC
 TGACACAACACGACGACCCTCTGCAAAATCAACA**cg**ATCA**CAG**AAAAGTAAT**CCAT**GATACACTTGATAAGCACTAGGG
 GGTCTTTGTGT

GGCCGGCATGGTCCCAGCCTCCTCGCTGGCGCCGGCTGGGCAACATTCCGAGGGGACCGTCCCCCTCGGTAAT

GGCGAATGGGAGGATAAGTAGGTGACTCACACCACAAGT**CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGT**

CTTGAGGGTTTTTTGTC

TTAATTAAAGTTTAAAC

- c) Origen y función específica de cada parte del inserto:

Inserto MERS-CoV-S0:



- Nucleótidos 1-17: secuencia introducida con dianas de restricción para clonaje molecular.
- Nucleótidos 18-4062: ORF-SPIKE SO (cepa Jordan1_2015 Genbank accession KU233364)
- Los residuos de sitios de procesamiento por furina en S1/S2 y S2' se sustituyen por los encontrados en la secuencia de BatCoV-HKU4 (S1/S2: ⁷⁴⁸RSVR⁷⁵¹ por ⁷⁴⁸YSAS⁷⁵¹ ; S2' ⁸⁸⁴RSAR⁸⁸⁷ por ⁸⁸⁴SSYR⁸⁸⁷ (según se describe en Millet and Whittaker, PNAS 111(42)15214-15219)

Inserto Spike Fragment S1:

- Nucleótidos 1-17 y 2310-2322: secuencias con dianas de restricción para clonaje molecular.
- Nucleótidos 18-2222: ORF-S1 (cepa Jordan1_2015 Genbank accession KU233364)
- Nucleótidos 2223-2282: secuencia epitopo SD6 (FMDV CS8c1)²
- Nucleótidos 2283-2309: secuencia epitopo V5 (SV5)³

Inserto Spike Fragment RBD:

- Nucleótidos 1-17 y 801-813: secuencias con dianas de restricción para clonaje molecular.
- Nucleótidos 18-713: ORF-RBD (cepa Jordan1_2015 Genbank accession KU233364)
- Nucleótidos 714-773: secuencia epitopo SD6 (FMDV CS8c1)²
- Nucleótidos 774-800: secuencia epitopo V5 (SV5)³

d) Descripción del método utilizado para la transformación:

Los transgenes (S0, S1 y RBD) serán clonados en BclI y SalI en el plásmido pBSK+segS que contiene el segmento S del virus de modo que sustituyan el gen *NSs*. Posteriormente, la línea celular que expresa constitutivamente la polimerasa T7 (BSR/T7) será transfectada con 2 plásmidos que codifican el genoma del segmento L y M completo de RVFV de la cepa 56/74 o de la variante 40Fp8 más un tercer plásmido con el segmento S modificado conteniendo el transgén MERS-CoV deseado. Los virus serán recuperados del sobrenadante celular y amplificados en células susceptibles a RVFV, para generar un stock de trabajo.



- e) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto: El gen S0 codifica la proteína Spike de MERS-CoV en su forma estabilizada y no procesada al carecer de los sitios de procesamiento proteolítico. Se asemejaría a la estructura de la glicoproteína S presente en la membrana del virus antes de su interacción con la célula huésped. El gen S1 corresponde a un fragmento procesado por proteólisis que contiene el sitio de unión al receptor celular (DPP4). El gen con la secuencia RBD corresponde al dominio de unión al receptor.
- f) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto: No aplica
- g) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente? Si
- h) ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese. No
- i) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? 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:

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.

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: Desconocido



- b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese: Desconocido. Sería esperable un defecto en la tasa de crecimiento en cultivo celular en comparación con el organismo parental
 - c) ¿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 esperable
 - 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: Se incluyen marcadores positivos (moleculares y fenotípicos), en concreto las secuencias correspondientes a los epitopos reconocidos por los anticuerpos monoclonales anti-V5 y SD6
- 2) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*): No se ha analizado a nivel genético. Se realizará una vez obtenido el OMG
- 3) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos: Negligible
- 4) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: Tras su rescate, formación de placas de lisis en cultivo celular. Detección de expresión de antígenos específicos mediante técnica western blot e inmunofluorescencia. Aislamiento en cultivo celular
 - b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: No aplica. No se liberará al medio ambiente

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: 15-20 mL
 - b) Número de plantas:
 - c) Número de animales: En cada experimento para analizar la respuesta inmune inducida se podrán utilizar aproximadamente 50 ratones de tipo 129Sv/Ev o BALB/c. Para



analizar la inmunogenicidad conferida por los virus recombinantes los experimentos se realizarán con 1 grupo de ratones control no vacunados y al menos 4 grupos de animales inoculados con dosis diferentes (alta/baja) de los virus recombinantes. Los ratones recibirán una única inoculación intraperitoneal o intranasal. La inmunogenicidad específica se evaluará mediante la detección de anticuerpos específicos en el suero a diferentes días post-inoculación. La valoración de la respuesta celular específica de los antígenos recombinantes S0, S1 o RBD se podrá medir mediante la re-estimulación de linfocitos de sangre periférica o de bazo mediante la incubación con apropiados estímulos antigénicos en forma de péptidos proteína recombinantes o células presentadoras de antígeno

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

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

Enero-diciembre de 2024

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

Se comprobará que el virus recombinante se mantiene atenuado en ratones inmunocompetentes. Por ello se comprobará el potencial del virus recombinante para inducir respuesta inmune en modelos animales (ratones). Se analizará la respuesta de anticuerpos, así como la capacidad de inducción de respuesta celular específica. En caso afirmativo se planteará la capacidad inmunoproliférica del OMG en un huésped natural (pequeño rumiante) analizándose igualmente las respuestas inmunitarias inducidas por la vacunación.

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

NO procede de otro centro

5) 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*):

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].



En caso necesario 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.

- 6) Descripción de los métodos de manejo de los OMG (*incluyendo descripción de las fases de cultivo y concentración máxima de OMG en el cultivo*): Fases: rescate de virus mediante transfección con plásmidos. Amplificación de stocks en volúmenes de 5-10ml. Titulación de stocks. Títulos máximos estimados en cultivo 10^6 - 10^7 pfu /ml. Análisis de expresión de transgenes, análisis de estabilidad de transgenes a nivel genético y fenotípico. Infecciones en cultivos para la determinación de cinéticas de crecimiento en células competentes de interferón y en células de insecto (mosquito). Tras comprobar su rescate mediante la detección de efecto citopático en cultivo celular se someterán a un pase adicional para generar un stock de título suficiente que permita realizar experimentos in vivo (concentración máxima esperada 10^7 pfu/ml)
- 7) Descripción de las medidas de confinamiento y protección que vayan a aplicarse:

Todas las manipulaciones para la obtención del OMG se realizarán en cabinas de seguridad biológica dentro del laboratorio de nivel 3 del CISA, cuyo acceso se encuentra restringido al personal ajeno al proyecto o seguridad biológica. La zona de contención biológica de 10.824 m², posee unas características arquitectónicas y funcionales reconocidas internacionalmente para garantizar la bioseguridad.

La característica principal del laboratorio es proporcionar un grado de estanqueidad total para evitar la liberación al exterior de cualquier agente patógeno sobre el que se estén llevando a cabo trabajos de investigación. Para asegurar unas correctas medidas de seguridad, el Centro está diseñado siguiendo aspectos arquitectónicos, funcionales y buenas pautas de trabajo adecuados e integrados.

Dentro de los **aspectos arquitectónicos y estructurales**, el Centro está construido en hormigón armado hidrófugo, cuyo interior está pintado con pintura epoxídica para posibilitar las operaciones de descontaminación. Existen también ventanas blindadas de seguridad. Todas las entradas a boxes y diferentes zonas o laboratorios, así como las de emergencia, presentan puertas con cerradura de seguridad y ajuste neumático. El Centro presenta una estructura tipo “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 un sistema de filtración de alta eficacia del aire mientras que la planta inferior está habilitada para los procesos de gestión de residuos sólidos y efluentes y para la entrada y salida de animales y materiales mediante sistemas SAS y *airlocks*. Para asegurar un funcionamiento correcto incluso bajo situaciones de emergencia, todos los dispositivos de seguridad se encuentran instalados de forma redundante (duplicados) o en algunos casos por triplicado.

-
- **Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad.** Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: <https://bch.cbd.int/protocol/>



Dentro de las **características funcionales**, se encuentran las siguientes:

- Tratamiento del **aire y ventilación**, estando las condiciones termo-higrométricas reguladas en todo momento. La humedad relativa se mantiene a niveles reducidos (35%) para evitar así que agentes biológicos aerotransportables queden fijados en codos y rugosidades del sistema de circulación del aire.
- Establecido en toda la zona biocontenida existe un **mantenimiento de presión negativa** respecto a la atmosférica en gradiente diferencial unidireccional de flujo continuo en los laboratorios y en cascada en los boxes de animales experimentación, con pasos de entre 25 y 35 Pa, generado en extracción dinámica, consiguiendo que el aire siempre circule de zonas teóricamente menos contaminadas a más contaminadas. El 100% del aire que entra vuelve a salir por lo que en ningún momento se recircula el aire.
- El **aire de salida es filtrado** mediante un sistema simple o doble seriado de filtros H14 HEPA (High Efficiency Particulate Air) consistente en una malla filtrante con paso de poro de 99.995% para partículas de máximo poder de penetración en superficie (MPPS) (0.12 μm -0.20 μm). Existen diferentes zonas de filtración de salida independientes, correspondientes a distintas secciones del laboratorio; de esta forma en caso de problemas puede evaluarse la efectividad de la zona afectada por separado.
- El control y **tratamiento de residuos líquidos** generales tiene lugar en la planta inferior del Centro. Con carácter previo se realiza una separación del 100% de los sólidos conformados presentes en el efluente y el 50% de los sólidos en suspensión. Posteriormente se trata el efluente mediante una esterilización fisicoquímica en 3 reactores de 3 m³ controlando temperatura, presión y pH. La temperatura se eleva por encima de 136°C durante un tiempo aproximado de 22 minutos. La fase química se realiza mediante la inyección de peróxido de hidrógeno durante el tratamiento térmico. Existe un sistema adicional de tratamiento de efluentes en casos de emergencia por tratamiento químico.
- Para el control y **tratamiento de sólidos biocontaminados** existe un horno crematorio pirolítico, diferentes autoclaves de vapor y la presencia de sistemas de descontaminación química (SAS o airlocks) a base de peróxido de hidrógeno gas o mediante ducha química superficial.

A pesar de todos los recursos tecnológicos y de ingeniería, el buen funcionamiento del área de biocontención se culmina con una correcta actuación del personal trabajador correctamente formado, adoptando de forma obligada medidas de prevención de riesgos laborales.

Controles de entrada y salida del laboratorio. La entrada al laboratorio está controlada y supervisada rigurosamente. Sin acreditación correspondiente, no está permitido el acceso. Los visitantes han de ir acompañados en todo momento por el personal de Seguridad Biológica. Una vez en el interior es necesario pasar por un vestuario para liberarse de toda la ropa y objetos personales antes de acceder a la zona biocontenida. El acceso a la zona de Alta Contención Biológica (NCB3), presenta un riesgo especial para los trabajadores por lo que a esta zona sólo puede acceder personal especialmente formado y autorizado para trabajar en estas condiciones. Una serie de vestuarios a la entrada y duchas a la salida aseguran la descontaminación obligatoria del personal. Cada persona que abandone el laboratorio deberá seguir escrupulosamente unas pautas de descontaminación, entre las que se incluye la obligación de descontaminación por arrastre y dilución gracias a la toma de una ducha automática de agua de 3 minutos de duración.



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

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

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

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

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

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



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

- Inactivación de residuos en CSB mediante procedimientos normalizados.
- Inactivación/desinfección 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 declarada como nivel 3 de contención biológica por el Instituto Regional de Seguridad y Salud en el Trabajo de la CAM, auditada interna y externamente en riesgo biológico por empresas ajenas, cualificada anualmente por empresa especializadas en CSB y filtración y verificada por el equipo propio de seguridad biológica periódicamente de forma rutinaria y frente a operaciones de mantenimiento correctivo.
- Se dispone de procedimientos de bioseguridad por actividades tales como, investigadores, animalario, seguridad biológica, mantenimiento, limpieza, vigilancia perimetral y equipo médico, donde se especifican las normas de bioseguridad para descontaminaciones, gestión de residuos, operaciones de mantenimiento correctivo, envíos y recepción de muestras, transporte interior, uso de *airlocks* y SAS, etc.
- Se dispone de un programa mensual, bimestral, trimestral, cuatrimestral, semestral y anual de actuaciones de verificación y seguimiento de instalaciones críticas.
- Se dispone de documentos de control de acciones, trabajos y seguimiento de parámetros de bioseguridad.
- Se dispone de estación informática de control y seguimiento de parámetros esenciales de bioseguridad e infraestructura de mantenimiento redundante (interior NCB3- exterior).
- Se dispone de estación informática de seguimiento de parámetros para tratamiento de efluentes redundante (interior NCB3 y exterior).
- Se dispone de redundancia en suministro eléctrico con dos líneas de alta tensión, dos transformadores de baja autoconmutados, dos grupos electrógenos y dos UPS /SAI.
- Todas las operaciones de mantenimiento preventivo se encuentran verificadas.
- Se realiza tratamiento de residuos “in situ”.



- La instalación dispone de un plan de emergencias de actuación en caso de accidente biológico y plan de evacuación sobre incidentes en incendios, aviso de bomba, accidente biológico químico y evacuación de accidentados.
- 2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes: 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.

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 a seguir son las recogidas en el *Manual de Bioseguridad para trabajos en el animalario con fiebre del Valle del Rift* y *Manual de procedimientos Generales de Bioseguridad para trabajos con RVF*. 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.

GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

- 1) Encargado de la gestión de residuos:



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

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

1) Entidad

Nombre: Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA); Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA); Ministerio de Ciencia e Innovación

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

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Esther Esteban Rodrigo

NIF:05271582M

Cargo: directora del INIA

Tel: 913473900

Fax:

Correo electrónico: Esther.esteban@inia.csic.es

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Alejandro Brun Torres

NIF: 02855574D

Cargo: Investigador científico

Tel:916202300

Fax:916202247

Correo electrónico: brun@inia.csic.es

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

Nombre y apellidos: Laura Pérez Palancar

NIF: 53043241C

Cargo: Jefa de Area de Animalario y Seguridad Biológica

Tel: 916202300

Fax: 916202247

Correo electrónico: laura.perez@inia.csic.es

5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: Laura Perez Palancar

II.



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

(En el caso de que se notifiquen varias actividades de tipo 1, deberá rellenarse este apartado y adjuntar un cuadro resumen en que se recojan todas las actividades, según el modelo que figura en el anexo).

- 1) Objetivo de la actividad: Evaluar la capacidad del virus de la fiebre del Valle del Rift como vector de antígenos heterólogos de relevancia inmunogénica en rumiantes.

El desarrollo de métodos de genética inversa para el virus de la fiebre del Rift ha facilitado la manipulación de su genoma y la generación de mutantes de delección altamente atenuados in vivo. Por otra parte, la generación de variantes virales por pases seriados en presencia de drogas mutagénicas permitió identificar ciertas mutaciones implicadas en una profunda atenuación del virus. Debido al tropismo del virus por células dendríticas y macrófagos (células esenciales en presentación antigénica) este virus posee unas condiciones ideales como posible vector de antígenos y que merecen ser exploradas en mayor detalle. Por ello nos interesa evaluar su potencial como vector o plataforma para la expresión de antígenos heterólogos de interés. En este contexto pretendemos evaluar esta capacidad mediante la generación de variantes víricas atenuadas que codifiquen antígenos vacunales de otros patógenos importantes de los animales rumiantes. En el caso de esta solicitud se generarían virus de la fiebre del Valle de Rift atenuados recombinantes (rRVFV) que expresan tras la infección en células antígenos del coronavirus MERS (MERS-CoV) que afecta al ser humano en contacto con animales infectados (camélidos) Pretendemos comprobar la viabilidad de virus recombinantes que expresen el antígeno S en estado prefusión o fragmentos S1 y RBD Para ello se realizarán ensayos de caracterización fenotípica (nivel de expresión, crecimiento en cultivo, estabilidad, etc) y se comprobará la capacidad de estos virus recombinantes para inducir respuestas inmunitarias específica de los antígenos recombinantes.

- 2) Duración prevista de la actividad: hasta diciembre de 2022

(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).

Los experimentos se llevarían a cabo a lo largo del año 2024, ya que la fecha posible de inicio del proyecto sería enero 2023

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).

El **organismo receptor** es un virus de la fiebre del Valle del Rift (cepa 56/74) o su variante hiperatenuada 40Fp8. Este virus se obtiene a partir de un clon infectivo mediante transfección de células eucariotas empleando cDNA del virus clonado en plásmidos. El virus resultante modificado carecen del gen no estructural NSs (Δ NSs) por lo que es sensible a la acción del interferón de tipo I, siendo completamente avirulento en animales inmunocompetentes tal y como se describió inicialmente por Muller et al. (*Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment*. Am J Trop Med Hyg. 1995;53(4):405-11. Epub 1995/10/01. PubMed PMID: 7485695) o más adelante experimentalmente por Bird BH, et al. *Rift valley fever virus lacking the NSs and NSm genes is highly attenuated, confers protective immunity from virulent virus challenge, and allows for differential identification of infected and vaccinated animals*. J Virol. 2008;82(6):2681-91. Epub 2008/01/18. doi: JVI.02501-07 [pii] 10.1128/JVI.02501-07. PubMed PMID: 18199647.) Como **organismo(s) donante(s)** se parte de secuencias sintéticas del gen de la proteína S del MERS-CoV (cepa Jordan1_2015). Esta secuencia y sus derivadas (S1 y RBD) se obtendrán mediante síntesis genética por una compañía biotecnológica especializada y se insertarán en un plásmido de expresión eucariota tipo pCDNA3.1. Como **organismos modificados genéticamente** resultantes se esperan obtener los siguientes dependiendo de su viabilidad y estabilidad en cultivos.

- a) r56/74- Δ NSs::S0-MERSCoV,
- b) r56/74- Δ NSs::S1-MERSCoV
- c) r56/74- Δ NSs::RBD-MERSCoV
- d) r40Fp8- Δ NSs::S0-MERSCoV,
- e) r40Fp8- Δ NSs::S1-MERSCoV,
- f) r40Fp8- Δ NSs::RBD-MERSCoV,

Para su generación se parte de plásmidos pBSK(+) que contienen la secuencia promotora (P) de la RNA polimerasa del fago T7 y secuencias de terminación (T) de transcripción junto con la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV). Entre ambas secuencias reguladoras se insertan las secuencias antigenómicas de los tres segmentos del ARN del virus (L, M y S). El segmento S se ha modificado por la delección completa del gen NSs y la inserción en su lugar de un sitio de clonaje (CS) para poder insertar secuencias heterólogas. La transfección de los tres plásmidos en células BSR/T7 (que expresan establemente la RNAPol T7) permitiría el rescate de virus recombinantes. Los virus que se generan son virus defectivos en la expresión de NSs y se encuentran muy atenuados por lo que **no se esperan efectos nocivos para humanos ni animales**. Su uso está confinado a las actividades de experimentación en un nivel de seguridad BSL-3, por lo que no deberían tener **ningún efecto sobre el medio ambiente**

2) Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

(Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 4 de la Directiva 2009/41/CE y, en caso de ser aplicable, otros sistemas de clasificación nacionales e



internacionales existentes, por ejemplo, la Directiva 2000/54/CE sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo).

- Tipo 1
- Tipo 2
- Tipo 3
- Tipo 4

- 3) Probabilidad de que se produzcan efectos nocivos y gravedad de los mismos, en función de:
Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

Todas las actividades que implican la manipulación, propagación y administración de los virus generados se encuentran confinadas en nivel de seguridad BSL3 y BSL3+. La exposición humana se reduce al máximo mediante el empleo de medidas de protección individual para el personal de laboratorio involucrado, junto con la manipulación obligatoria en cabinas de seguridad exclusivas habilitadas a tal efecto en nivel de seguridad BSL-3+. La experimentación animal se lleva a cabo con las mismas medidas de protección personal en boxes de uso exclusivo que se descontaminan a su finalización en atmósfera de peróxido de hidrógeno. La concentración de los virus generados será de 10^8 pfu/ml como máximo. En cuanto a las condiciones de cultivo y propagación de los organismos generados se considera que la exposición al entorno está altamente minimizada por su confinamiento y la restricción de su manipulación dentro de un laboratorio de alta seguridad biológica.

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

Actividad confinada de tipo 3, grado 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) está ubicado a 700 metros de la localidad de Valdeolmos. Valdeolmos es un municipio de bajo número de habitantes (< 1000). Se asienta en una penillanura a una altitud de 685 m sobre el nivel del mar rodeado de tierras de cultivo de secano (trigo, centeno, avena) y no se encuentra cercana ninguna explotación ganadera. Es zona CEPA. El centro presenta un conjunto de instalaciones reunidas en un solo edificio subdividido en área administrativa, zona NCB2 y zona NCB3. Actualmente trabajan alrededor de 170 personas en las diferentes áreas.

- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

Indicadas en el Plan de emergencia y evacuación



- c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales. Explicados anteriormente y desarrollados en el Plan de emergencias y evacuación y en la parte A (anexo de documentación correspondiente a la solicitud)
- d) Planes de emergencia.
El Plan de emergencias y evacuación del laboratorio se ha incluido en la documentación correspondiente a la solicitud.