



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

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

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad:

a) Entidad:

Nombre: Universitat Pompeu Fabra (UPF)
Dirección postal: Dr. Aiguader, 88 – 08003 Barcelona

b) Representante legal de la entidad:

Nombre y apellidos: Jaume Casals i Pons
NIF: 37317474-C
Cargo: Rector
Tel: 93 542 20 00
Fax: 93 542 20 02
Correo electrónico: rector@upf.edu

c) Responsable científico de la actividad:

Nombre y apellidos: Juana Díez Antón
NIF: 74181228-H
Cargo: Investigadora Principal del Grupo de Virología Molecular, Coordinadora de la Unidad de Virología, Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universidad Pompeu Fabra
Tel: 93 316 08 62 - fax: 93 316 09 01
Correo electrónico: juana.diez@upf.edu

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

Nombre y apellidos: Andreas Franz Meyerhans
NIF: Y-0810274-K
Cargo: Responsable del laboratorio de contención 309.02 con nivel de seguridad biológica de nivel 3
Tel: 93 316 08 31
Fax: 93 316 09 01
Correo electrónico: andreas.meyerhans@upf.edu



e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto:

El responsable de bioseguridad de la instalación actúa como persona de contacto.

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

SI NO

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

a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación: 22/11/2016.

b) Número de referencia del expediente: A/ES/16/I-21.

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

Nombre OMG: **CHIK-RLuc y CHIKV-LR 5_GFP**

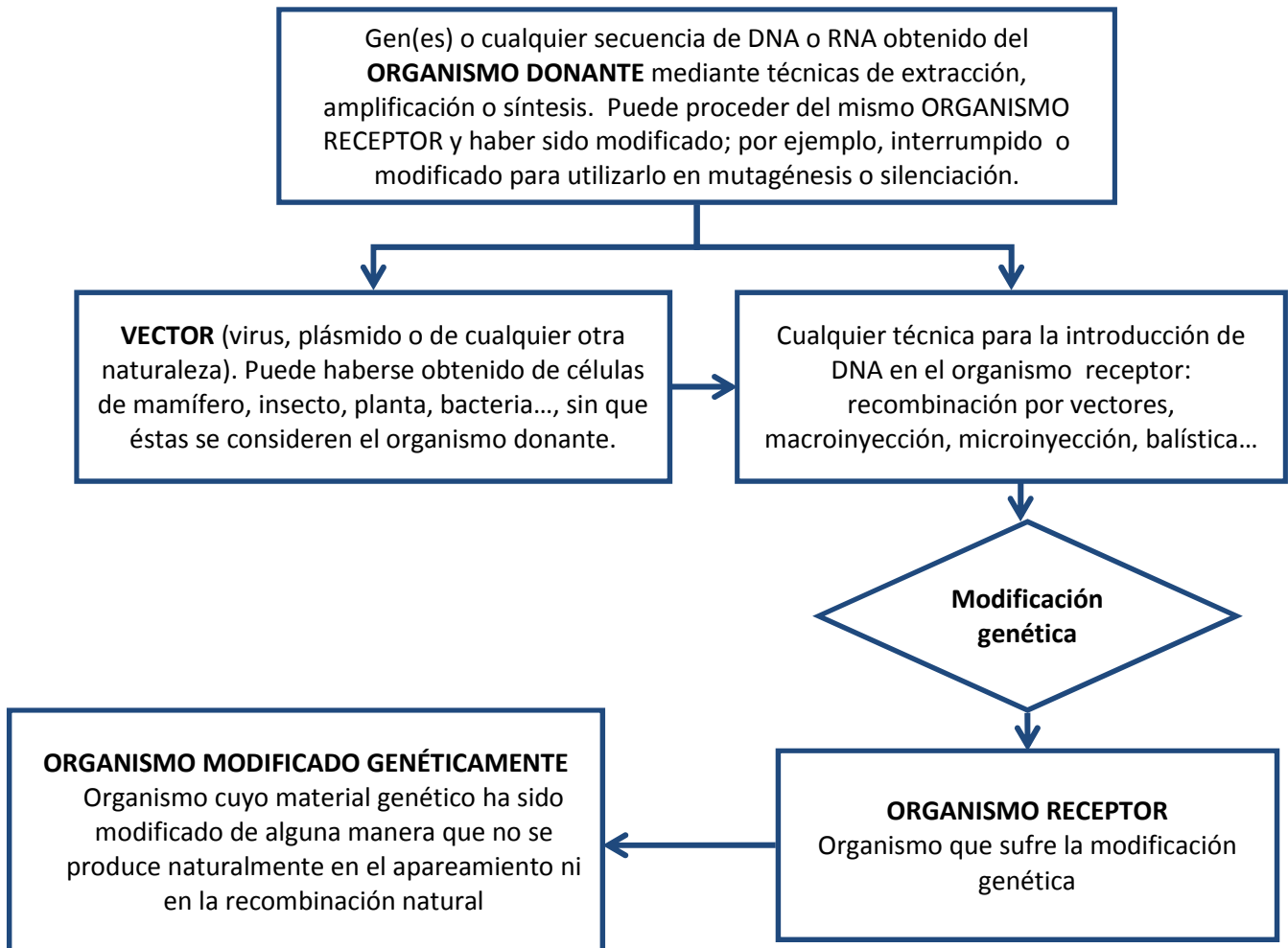
Introducción transitoria del genoma viral del CHIKV a través de la transfección de su material genético en cultivos celulares para investigar el efecto del CHIKV en células humanas en condiciones normales y bajo el agregado de sustancias químicas y otras. Se cuantifica la replicación viral mediante la medición de los genes introducidos de luciferasa y/o la proteína fluorescente verde (GFP).

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: Virus del chikungunya (CHIKV).
Taxonomía: Género Alphavirus, familia Togaviridae.
Nombre común: Virus del chikungunya.
- 2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento:
 - a) Técnicas de aislamiento: El virus puede ser aislado de la sangre de pacientes infectados durante los primeros días de infección. Existen varios métodos. Ver: **Konstantin et al 2006, adjuntado**.
 - b) Técnicas de identificación: Existen diversos métodos para la identificación y el diagnóstico. Las más comunes son la detección de anticuerpos IgM e IgG específicos del CHIKV por ELISA. También por métodos de PCR pueden detectarse la presencia del virus en muestras serológicas de pacientes infectados.
 - c) Marcadores genéticos: **Konstantin et al 2006, adjuntado**.
 - d) Marcadores fenotípicos: la infección por Chikungunya se caracteriza por fiebre seguida de dolor articular. Otros síntomas incluyen: dolor muscular, dolor de cabeza, náusea y fatiga. El virus puede causar infección aguda, subaguda o crónica. Los síntomas normalmente se resuelven y el paciente puede recuperarse plenamente. En pocos casos algunos síntomas pueden permanecer por varios meses. No son frecuentes complicaciones serias.
 - e) Estabilidad genética: El virus del chikungunya posee un genoma de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva. Dicho genoma se amplifica mediante la actividad de una RNA polimerasa dependiente de RNA. La fidelidad de estas RNA-polimerasas virales es muy baja y producen típicamente alrededor de un cambio de nucleótido por genoma.
- 3) Posibles modificaciones genéticas anteriores: se desconocen modificaciones anteriores.
- 4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?:
SI NO
- 5) En caso afirmativo, especificar para qué clase de los organismos (seres humanos, animales, plantas) se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos extracelulares: el virus se transmite de humano a humano por las mordidas de los mosquitos vectores *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.
- 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.): según la OMS y el NIH el CHIKV se considera un agente biológico de nivel 3.
 - a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?:

El *chikungunya* se caracteriza por un brote súbito de fiebre, acompañado por dolor en las articulaciones. Otros síntomas y molestias durante la fase crónica pueden incluir fatiga y depresión además de dolores musculares, dolores de cabeza, náusea, fatiga y sarpullidos. La mayoría de los pacientes se recuperan totalmente, pero en algunos



casos, la afectación de las articulaciones puede persistir de manera crónica. Aunque las complicaciones serias no son frecuentes, en el caso de adultos mayores, niños y embarazadas la enfermedad puede agravarse.

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

SI NO

Porqué: Desconocemos la existencia de cepas no virulenta.

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

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

Los investigadores principales de la Unidad de Virología (<https://www.upf.edu/web/virology-unit>), Prof. Juana Diez y Prof. Andreas Meyerhans, del Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad Pompeu Fabra y responsables científicos de la actividad y de la bioseguridad de la instalación respectivamente, tienen una vasta experiencia (desde los años 1985 y 1988) investigando y trabajando con (i) virus infecciosos wild-type (HIV, HCV, HSV, Polio y diversos virus emergentes), y (ii) con sus respectivos clones moleculares. La sala donde se trabajará con el OMG está en funcionamiento desde del año 2010 y cuenta con todas las medidas de contención de seguridad biológica de nivel 3 que establece la normativa y ya ha sido debidamente legalizada por el Ministerio para trabajar con el OMG de la hepatitis C.

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

a) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?: No, como cualquier virus depende de una célula huésped.

En caso afirmativo: No procede.

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo: No.

- | | |
|-------------------------------|--------------------------|
| i) esporas | <input type="checkbox"/> |
| ii) endosporas | <input type="checkbox"/> |
| iii) quistes | <input type="checkbox"/> |
| iv) esclerocios | <input type="checkbox"/> |
| v) esporas asexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |
| vi) esporas sexuales (hongos) | <input type="checkbox"/> |
| vii) otros, especifíquese | |

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia: no procede.

d) Posibles nichos ecológicos: Ser humano.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: se desconoce.



- 10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:
- a) Implicaciones en procesos ambientales (p.ej. fijación del nitrógeno o regulación del pH del suelo): no procede.
 - b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos: no procede.
- 11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor: la enfermedad está presente en África, Asia y en India. En 2007, la transmisión de la enfermedad se reportó por primera vez en Europa, en un brote localizado al noroeste de Italia. En diciembre del 2013, la OPS/OMS recibió la confirmación de los primeros casos de transmisión autóctona del chikungunya en las Américas.
- 12) Hábitat natural del organismo: Poblaciones humanas y mosquitos.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

Dos organismos donantes para dos vectores:

OMG (A) CHIKV-LR 5_GFP

- 1) Nombre científico: *Aequorea victoria*.
Taxonomía: Género *Aequorea*, Familia *Aequoreidae*.
Nombre común: Gelatina cristal.
- 2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: ADN correspondiente al gen de la proteína fluorescente verde (GFP).

OMG (B) CHIK-RLuc

- 1) Nombre científico: *Renilla reniformis*.
Taxonomía: Género *Renilla*, Familia *Renillidae*.
Nombre común: *Renilla reniformis* o Pensamiento de Mar.
- 2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: ADN correspondiente al gen de la luciferasa.
- 3) Método de obtención:
- a) Extracción
 - b) PCR
 - c) Síntesis *in vitro*
- 4) Función del gen/genes en el organismo donante:

La luciferasa es un término genérico para la clase de enzimas oxidativas utilizados en bioluminiscencia. La luciferasa consume/oxida el pigmento luciferina con gasto de ATP (que en la célula suele proceder de la transformación del pirofosfato por el enzima sulfurilasa). La reacción de oxidación libera luz, de color diferente según la composición de la luciferina y luciferasa, lo que explica la producción de varios colores, en distintas especies de organismo. La función de la GFP es generar bioluminiscencia en el hábitat natural. El propósito de la bioluminiscencia primaria y la fluorescencia por GFP en la Gelatina Cristal no está bien descrito.



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: no procede.

i) seres humanos
ii) animales
iii) plantas

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad? no procede.

c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo? no.

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:

Insertar el gen de la renilla luciferasa y la GFP junto al material genético del virus para que pueda ser expresado en células de mamífero. En biología molecular estos genes se usan principalmente como genes reporteros en estudios sobre la regulación de la transcripción. En este caso concreto, medir la actividad luminiscente equivale a medir el nivel de expresión de proteínas virales, simplificando así la cuantificación de la expresión viral.

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

CHIKV-Rluc: El vector fue construido utilizando fragmentos sintéticos del cDNA y de la cepa Mauritius del CHIKV. El marcador de la luciferasa fue insertado en la región codificante para la proteína nsP3 mediante técnicas de clonación estándar. El virus se obtiene mediante transcripción in vitro en células BHK-21. Información detallada en: Pohjala et al 2011, adjuntado.

CHIKV-LR 5_GFP: El vector se deriva del clon infeccioso CHIKV-LR ic. El promotor SP6 fue introducido antes de la region 5' del cDNA y sitios de linearización por NotI fueron añadidos en la región 3' del cDNA. La secuencia codificante para la proteína GFP fue introducida en la región 5' de los genes estructurales. Los virus infecciosos se generan mediante linearización por NotI y transcripción in vitro utilizando el promotor SP6. El RNA resultante se electropora en células BHK-21. 48h luego el sobrenadante de los cultivos

conteniendo el virus se titula y se guarda a -90°C. Información detallada en: Konstantin et al 2006, adjuntado.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a. Tipo e identidad del vector: Ver 3.

b. Si se trata de un virus: no procede.

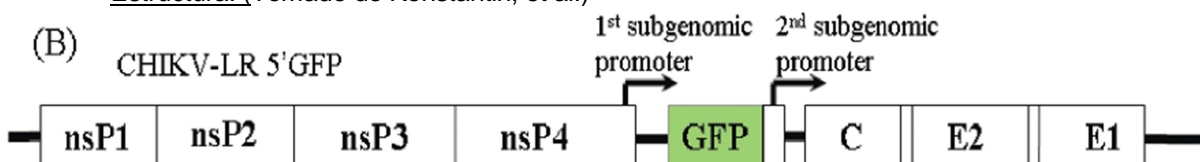
Es defectivo en replicación SÍ NO

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):

OMG (A) CHIKV-LR 5_GFP

El vector CHIKV-LR 5_GFP se ha descrito en: Tsetsarkin, Konstantin, et al. "Infectious clones of Chikungunya virus (La Reunion isolate) for vector competence studies." *Vector-Borne & Zoonotic Diseases* 6.4 (2006): 325-337.

Estructura: (Tomado de Konstantin, et al.)



Secuencia:

```
>gi|160426352|gb|EU224269.1| Cloning vector pCHIK-LR 5`GFP, complete sequence
ATGGCTGCGTGAGACACACGTAGCCTACCAGTTTCTTACTGCTCTACTCTGCAAAGCAAG
AGATTAATAACCCATCATGGATCCTGTGTACGTGGACATAGACGCTGACAGCGCCTTTTT
GAAGGCCCTGCAACGTGCGTACCCCATGTTTGAGGTGGAACCAAGGCAGGTCACACCGAA
TGACCATGCTAATGCTAGAGCGTTCTCGCATCTAGCTATAAACTAATAGAGCAGGAAAT
TGACCCCGACTCAACCATCCTGGATATCGGCAGTGCGCCAGCAAGGAGGATGATGTCCGA
CAGGAAGTACCACTGCGTCTGCCGATGCGCAGTGCGGAAGATCCCGAGAGACTCGCCAA
TTATGCGAGAAAGCTAGCATCTGCCGCAGGAAAAGTCCTGGACAGAAACATCTCTGGAAA
GATCGGGGACTTACAAGCAGTAATGGCCGTGCCAGACACGGAGACGCCAACATTCTGCTT
ACACACAGACGTCTCATGTAGACAGAGAGCAGACGTCGCTATATACCAAGACGTCTATGC
TGTACACGCACCCACGTGCTATACCACCAGGCGATTAAAGGGGTCCGAGTGGCGTACTG
GGTTGGGTTTCGACACAACCCCGTTCATGTACAATGCCATGGCCGGGTGCCTACCCCTCATA
CTCGACAAACTGGGCAGATGAGCAGGTAAGGCTAAGAACATAGGATTATGTTCAAC
AGACCTGACGGAAGGTAGACGAGGCAAGTTGTCTATTATGAGAGGGAAAAAGCTAAAACC
GTGCGACCGTGTGCTGTTCTCAGTAGGGTCAACGCTCTACCCGGAAAGCCGCAAGTACT
TAAGAGCTGGCACCTGCCATCGGTGTTCCATTTAAAGGGCAAACCTCAGCTTCACATGCCG
CTGTGATACAGTGGTTTCGTGTGAGGGCTACGTCGTTAAGAGAATAACGATGAGCCAGG
CCTTTATGGA AAAACACAGGGTATGCGGTAACCCACCACGCAGACGGATTCTGATGTG
CAAGACTACCGACACGGTTGACGGCGAAAGAATGTCATTCTCGGTGTGCACATACGTGCC
GGCGACCATTTGTGATCAAATGACCGGCATCCTTGCTACAGAAGTCACGCCGGAGGATGC
```




ACAGAAGCTGTTGGTGGGGCTGAACCAGAGAATAGTGGTTAACGGCAGAACGCAACGGAA
TACGAACACCATGAAAAATTATCTGCTTCCCCTGGTTCGCCCAAGCCTTCAGTAAGTGGGC
AAAGGAGTGCCGGAAAGACATGGAAGATGAAAACTCCTGGGGGTGAGAGAAAGAACT
GACCTGCTGCTGTCTATGGGCATTCAAGAAGCAGAAAACACACACGGTCTACAAGAGGCC
TGATACCCAGTCAATTCAGAAGGTTGAGGCCGAGTTTGACAGCTTTGTGGTACCGAGTCT
GTGGTCGTCCGGTTGTCAATCCCTTTGAGGACTAGAATCAAATGGTTGTTAAGCAAGGT
GCCAAAACCGACCTGATCCATACAGCGGAGACGCCCGAGAAGCCCGGGACGCAGAAAA
AGAAGCAGAGGAAGAACGAGAAGCAGAACTGACTCGCGAAGCCCTACCACCTCTACAGGC
AGCACAGGAAGATGTTGAGGTCGAAATCGACGTGGAACAGCTTGAGGACAGAGCGGGCGC
AGGAATAATAGAGACTCCGAGAGGAGCTATCAAAGTTACTGCCCAACCAACAGACCAGT
CGTGGGAGAGTACCTGGTACTCTCCCCGACAGCCGACTACTACGTAGCCAGAAGCTCAGTCT
GATTCACGCTTTGGCGGAGCAAGTGAAGACGTGCACGCACAACGGACGAGCAGGGAGGTA
TGCGGTGCAAGCGTACGACGGCCGAGTCTAGTGCCTCAGGCTATGCAATCTCGCCTGA
AGACTTCCAGAGTCTAAGCGAAAGCGCAACGATGGTGTATAACGAAAAGAGAGTTTCGTA
CAGAAAGCTACACATATTGCGATGCACGGACCCCTGAACACCGACGAAGAGTCGTA
TGAGCTGGTGAAGGACAGAGGACAGAACAGTACGTCTACGACGTGGATCAGAGAAAG
ATGCTGTAAGAAGGAAGAAGCCGACGACTGGTACTGGTGGGCGACTTGACTAATCCGCC
CTACCACGAATTCGCATATGAAGGGCTAAAAATCCGCCCTGCCTGCCATACAAAATTGC
AGTCATAGGAGTCTTCGGAGTACCGGGATCTGGCAAGTCAGCTATTATCAAGAACCTAGT
TACCAGGCAGGACCTGGTACTAGCGGAAAGAAAAGAAAAGTCCCAAGAAATCACCACCGA
CGTGATGAGACAGAGAGGTCTAGAGATATCTGCACGTACGGTTGACTCGCTGCTCTTGAA
TGGATGCAACAGACCAGTGCACGTGTTGTACGTAGACGAGGCGTTTGCCTGCCACTCTGG
AACGCTACTTGTCTTGTGATCGCCTTGGTGGAGACCAAGGCAGAAAGTTGTACTTTGTGGTGA
CCCGAAGCAGTGCAGGCTTCTTCAATATGATGCAGATGAAAGTCAACTATAATCACAACAT
CTGCACCCAAAGTGTACCACAAAAGTATCTCCAGGCGGTGTACACTGCCTGTGACCGCCAT
TGTGTCATCGTTGCATTACGAAGGCAAAAATGCGCACTACGAATGAGTACAACAAGCCGAT
TGTAGTGGACACTACAGGCTCAACAAAACCTGACCCTGGAGACCTCGTGTAAACGTGCTT
CAGAGGGTGGGTTAAACAAGTCAAATTTGACTATCGTGGATACGAGGTCATGACAGCAGC
CGCATCCCAAGGGTTAACAGAAAAGGAGTTTACGCAGTTAGACAAAAGTTAATGAAAA
CCCGCTCTATGCATCAACGTGAGAGCACGTCAACGTACTCCTAACGCGTACGGAAGGTAA
ACTGGTATGGAAGACACTTTCCGGCGACCCGTGGATAAAGACGCTGCAGAACCCACCGAA
AGGAAACTTCAAAGCAACTATTAAGGAGTGGGAGGTGGAGCATGCATCAATAATGGCGGG
CATCTGCAGTACCAATGACCTTCGATACATTCCAAAATAAAGCCAACGTTTGTGGGC
TAAGAGCTTGGTCCCTATCCTCGAAACAGCGGGGATAAACTAAATGATAGGCAGTGGTC
TCAGATAATTCAAGCCTTCAAAGAAGACAAAAGCATACTCACCTGAAGTAGCCCTGAATGA
AATATGTACGCGCATGTATGGGGTGGATCTAGACAGCGGGCTATTTTCTAAACCGTTGGT
GTCTGTGTATTACGCGGATAACCACTGGGATAAATAGGCCTGGAGGGAAAATGTTCCGATT
TAACCCCGAGGCAGCATCCATTCTAGAAAAGAAAGTATCCATTCAAAAAGGGAAGTGGAA
CATCAACAAGCAGATCTGCTGACTACCAGGAGGATAGAAGACTTTAACCTAACCCAA
CATCATACCGGCCAACAGGAGACTACCACACTCATTAGTGCCGAACACCGCCAGTAAA
AGGGGAAAGAATGGAATGGCTGGTTAACAAGATAAACGGCCACCACGTGCTCCTGGTCAG
TGGCTATAACCTTGCCTACTAAGAGAGTCACTTGGGTAGCGCCGTTAGGTGTCCG
CGGAGCGGACTACACATAACCTAGAGTTGGGTCTGCCAGCAACGCTTGGTAGGTATGA
CCTAGTGGTCATAAACATCCACACACCTTTTCGCATACACCATTACCAACAGTGCCTCGA
CCACGCAATGAACTGCAAATGCTCGGGGGTACTCATTGAGACTGCTCAAACCGGGCGG
CTCTCTATTGATCAGAGCATATGGTTACGCAGATAGAACCAGTGAACGAGTCATCTGCGT
ATTGGGACGCAAGTTTAGATCGTCTAGAGCGTTGAAACCACCATGTGTCACCAGCAACAC
TGAGATGTTTTTCTATTACGCAACTTTGACAATGGCAGAAGGAATTTCAACTCATGT
CATGAACAATCAACTGAATGCAGCCTTCGTAGGACAGGTCACCCGAGCAGGATGTGCACC
GTCGTACCGGGTAAAACGCATGGACATCGCGAAGAACGATGAAGAGTGCCTAGTCAACGC
CGCTAACCTCGCGGGTTACCGGGTGGCGGTGTTTGAAGGCAGTATACAAAAAATGGCC
GGAGTCTTTAAGAACAGTGCAACACCAGTGGGAACCGCAAAAACAGTTATGTGCGGTAC
GTATCCAGTAATCCACGCTGTTGGACCAAACCTTCTAATTATTCCGGAGTCTGAAGGGGA
CCGGGAATTGGCAGCTGCCTATCGAGAAGTGCCAAAGGAAGTAACTAGGCTGGGAGTAAA
TAGTGTAGCTATACCTCTCCTCTCCACAGGTGTATACTCAGGAGGGAAAGACAGGCTGAC
CCAGTCACTGAACCACCTCTTACAGCCATGGACTCGACGGATGCAGACGTGGTCATCTA
CTGCCGCGACAAGAATGGGAGAAGAAAATATCTGAGGCCATACAGATGCGGACCCAAGT



AGAGCTGCTGGATGAGCACATCTCCATAGACTGCGATATTGTTTCGCGTGCACCCTGACAG
CAGCTTGGCAGGCAGAAAAGGATACAGCACCACGGAAGGCGCACTGTACTCATATCTAGA
AGGGACCCGTTTTTCATCAGACGGCTGTGGATATGGCGGAGATACATACTATGTGGCCAAA
GCAAACAGAGGCCAATGAGCAAGTCTGCCTATATGCCCTGGGGGAAAAGTATTGAATCGAT
CAGGCAGAAATGCCCGGTGGATGATGCAGACGCATCATCTCCCCCAAACACTGTCCCGTG
CCTTTGCCGTTACGCTATGACTCCAGAACGCGTCACCCGGCTTCGCATGAACCACGTCAC
AAGCATAATTGTGTGTTCTTCGTTTCCCCTCCCAAAGTACAAAATAGAAGGAGTGCAAAA
AGTCAAATGCTCTAAGGTAATGCTATTTGACCACAACGTGCCATCGCGGTAAGTCCAAG
GGAATATAGATCTTCCCAGGAGTCTGCACAGGAGGCGAGTACAATCACGTCACCTGACGCA
TAGTCAATTCGACCTAAGCGTTGATGGCGAGATACTGCCCGTCCCGTCAGACCTGGATGC
TGACGCCCCAGCCCTAGAACCAGCACTAGACGACGGGGCGACACACACGCTGCCATCCAG
AACCGGAAACCTTGCGGCCGTGTCTGATTGGGTAATGAGCACCGTACCTGTGCGCCGCC
CAGAAGAAGGCGAGGGAGAAACCTGACTGTGACATGTGACGAGAGAGAAGGGAATATAAC
ACCCATGGCTAGCGTCCGATTCTTTAGGGCAGAGCTGTGTCCGGTCGTACAAGAAACAGC
GGAGACGCGTGACACAGCAATGTCTCTTCAGGCACCACCGAGTACCGCCACGGAACCGAA
TCATCCGCCGATCTCCTTCGGAGCATCAAGCGAGACGTTCCCCATTACATTTGGGGACTT
CAACGAAGGAGAAATCGAAAGCTTGTCTTCTGAGCTACTAACTTTTCGGAGACTTCTTACC
AGGAGAAGTGATGACTTGACAGACAGCGACTGGTCCACGTGCTCAGACACGGACGACGA
GTTAAGACTAGACAGGGCAGGTGGGTATATATTCTCGTCGGACACCGGTCCAGGTCATTT
ACAACAGAAGTCAGTACGCCAGTCAGTGCTGCCGGTGAACACCCTGGAGGAAGTCCACGA
GGAGAAGTGTTACCCACCTAAGCTGGATGAAGCAAAGGAGCAACTATTACTTAAGAAACT
CCAGGAGAGTGCATCCATGGCCAACAGAAGCAGGTATCAGTCGCGCAAAGTAGAAAACAT
GAAAGCAGCAATCATCCAGAGACTAAAGAGAGGCTGTAGACTATACTTAATGTCAGAGAC
CCCAAAAGTCCCTACTTACCGGACTACATATCCGGCGCCTGTGTACTCGCCTCCGATCAA
CGTCCGATTGTCCAATCCCGAGTCCGCAGTGGCAGCATGCAATGAGTTCTTAGCTAGAAA
CTATCCAAGTGTCTCATACACAAATTACCGACGAGTATGATGCATATCTAGACATGGT
GGACGGGTCCGGAGAGTTGCCTGGACCGAGCGACATTCAATCCGTCAAACACTCAGGAGCTA
CCCGAAACAGCACGCTTACCACGCGCCCTCCATCAGAAGCGCTGTACCGTCCCATTCCA
GAACACACTACAGAATGTACTGGCAGCAGCCACGAAAAGAAACTGCAACGTCACACAGAT
GAGGGAATTACCCACTTTGGACTCAGCAGTATTCAACGTGGAGTGTTTCAAAAATTCGC
ATGCAACCAAGAATACTGGGAAGAAATTTGCTGCCAGCCCTATTAGGATAACAACCTGAGAA
TTTAGCAACCTATGTTACTAAACTAAAAGGGCCAAAAGCAGCAGCGCTATTTCGAAAAAC
CCATAATCTACTGCCACTACAGGAAGTACCAATGGATAGGTTTACAGTAGATATGAAAAG
GGACGTAAAGGTGACTCCTGGTACAAAGCATAACAGAGGAAAGACCTAAGGTGCAGGTTAT
ACAGGCGGCTGAACCTTGGCGACAGCATACTATGTGGGATTCACAGAGAGCTGGTTAG
GAGGCTGAACGCCGTCCTCCTACCCAATGTACATACTATTTGACATGTCTGCCGAGGA
TTTTCGATGCCATCATAGCCGCACACTTTAAGCCAGGAGACACTGTTTTGAAACGGACAT
AGCCTCCTTTGATAAGAGCCAAGATGATTCACTTTCGCTTACTGCTTTGATGCTGTTAGA
GGATTTAGGGGTGGATCACTCCCTGCTGGACTTGATAGAGGCTGCTTTTCGGAGAGATTT
CAGCTGTCACCTACCGACAGGTACGCGCTTCAAGTTTCGGCGCCATGATGAAATCAGGTAT
GTTTCTAACTCTGTTTCGTCAACACATTGTTAAACATCACCATCGCCAGCCGAGTGCTGGA
AGATCGTCTGACAAAATCCGCGTGCAGCGCCCTTTCATCGGCGACGACAACATAATACATGG
AGTCGTCTCCGATGAATTGATGGCAGCCAGATGTGCCACTTGGATGAACATGGAAGTGAA
GATCATAGATGCAGTTGTATCCTTGAAGCCCTTACTTTTTGTGGAGGGTTTATACTGCA
CGATACTGTGACAGGAACAGCTTGCAGAGTGGCAGACCCGCTAAAAGGCTTTTTAACT
GGGCAAACCGCTAGCGGCAGGTGACGAACAAGATGAAGATAGAAGACGAGCGCTGGCTGA
CGAAGTGATCAGATGGCAACGAACAGGGCTAATTGATGAGCTGGAGAAAGCGGTATACTC
TAGGTACGAAGTGCAGGGTATATCAGTTGTGGTAATGTCCATGGCCACCTTTGCAAGCTC
CAGATCCAACCTTCGAGAAGCTCAGAGGACCCGTATAACTTTGTACGGCGGTCTTAATA
GGTACGCACTACAGCTACCTATTTTGCAGAAGCCGACAGCAAGTATCTAAACACTAATCA
GGCGCGCCATGGTGAAGGAGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTTCG
AGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATG
CCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCT
GGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGACAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACC
ACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCA
CCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCG
ACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC



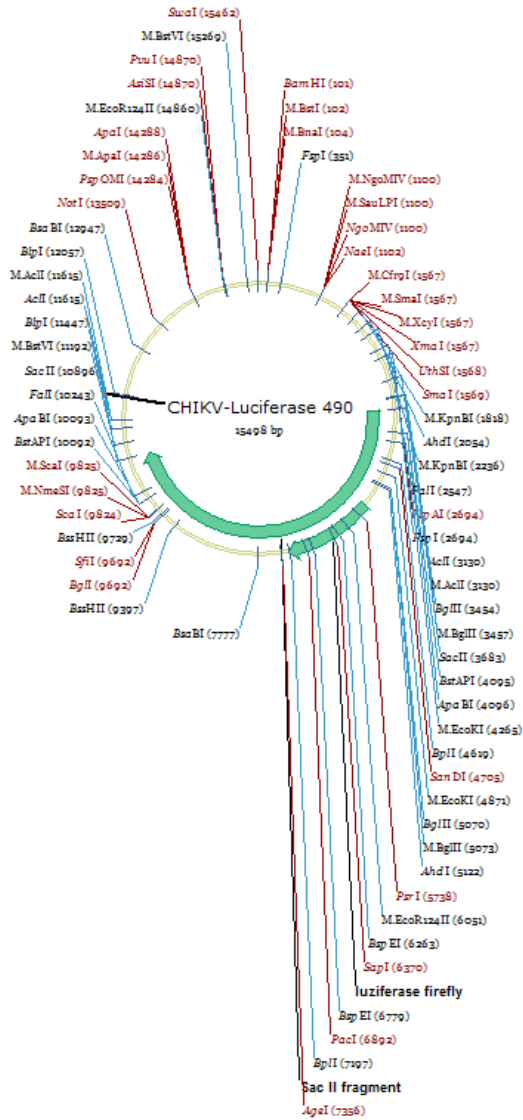
TGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGC
AGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGC
AGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCG
ACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATC
ACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGT
ACAAGTAGTTTTAAACCATGGCCACCTTTGCAAGCTCCAGATCCAACCTTCGAGAAGCTCAG
AGGACCCGTCATAACTTTGTACGGCGGTCTAAATAGGTACGCACTACAGCTACCTATTT
TGCAGAAGCCGACAGCAAGTATCTAAACACTAATCAGCTACAATGGAGTTCATCCCAACC
CAAACCTTTTTACAATAGGAGGTACCAGCCTCGACCCTGGACTCCGCGCCCTACTATCCAA
GTCATCAGGCCAGACCGCGCCCTCAGAGGCAAGCTGGGCAACTTGCCAGCTGATCTCA
GCAGTTAATAAACTGACAATGCGCGCGGTACCACAACAGAAGCCACGCAGGAATCGGAAG
AATAAGAAGCAAAAGCAAAAACAACAGGCGCCACAAAACAACAAAATCAAAGAAGCAG
CCACCTAAAAGAAACCGGCTCAAAGAAAAGAAAGCCGGGCCGAGAGAGAGGATGTGC
ATGAAAATCGAAAATGATTGTATTTTCGAAGTCAAGCACGAAGGTAAGGTAACAGGTTAC
GCGTGCCCTGGTGGGGGACAAAAGTAATGAAACCAGCACACGTAAGGGGACCATCGATAAC
CCGGACCTGGCCAAACTGGCCTTTAAGCGGTATCTAAGTATGACCTTGAATCGCGCAG
ATACCCGTGCACATGAAGTCCGACGCTTCGAAGTTCACCCATGAGAAACCGGAGGGGTAC
TACAACCTGGCACCGGAGCAGTACAGTACTCAGGAGGCCGTTTACCATCCCTACAGGT
GCTGGCAAACCAGGGGACAGCGGCAGACCGATCTTCGACAACAAGGGACGCGTGGTGGCC
ATAGTCTTAGGAGGAGCTAATGAAGGAGCCCGTACAGCCCTCTCGGTGGTGACCTGGAAT
AAAGACATTGTCACTAAAATCACCCCGAGGGGGCCGAAGAGTGGAGTCTTGCCATCCCA
GTTATGTGCCTGTTGGCAAACACCACGTTCCCCTGCTCCAGCCCCCTTGACGCGCCCTGC
TGCTACGAAAAGGAACCGGAGGAAACCTACGCATGCTTGAGGACAACGTCATGAGACCT
GGGTACTATCAGCTGCTACAAGCATCCTAACATGTTCTCCCCACCGCCAGCGACGCAGC
ACCAAGGACAACCTCAATGTCTATAAAGCCACAAGACCATACTTAGCTCACTGTCCCGAC
TGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGTCCCGTAGCACTAGAACGCATCAGAAATGAAGCG
ACAGACGGGACGCTGAAAATCCAGGTCTCCTTGCAAATCGGAATAAAGACGGATGACAGC
CACGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAACCACATGCCAGCAGACGCAGAGAGGGCG
GGGCTATTTGTAAGAACATCAGCACCGTGTACGATTACTGGAACAATGGGACACTTCATC
CTGGCCCCGATGTCCAAAAGGGGAAACTCTGACGGTGGGATTCACTGACAGTAGGAAGATT
AGTCACTCATGTACGCACCCATTTACCACGACCCCTCCTGTGATAGGTGGGAAAAATTC
CATTCCCGACCGCAGCACGGTAAAGAGCTACCTTGACGACGTCAGTGCAGAGCACCGCC
GCAACTACCGAGGAGATAGAGGTACACATGCCCCAGACACCCCTGATCGCACATTAATG
TCACAACAGTCCGGCAACGTAAGATCACAGTCAATGGCCAGACGGTGCAGTACAAGTGT
AATTGCGGTGGCTCAAATGAAGGACTAACAACACAGACAAAAGTGATTAATAACTGCAAG
GTTGATCAATGTATGCGCGGTACCAATCACAAAAGTGGCAGTATAACTCCCCTCTG
GTCCCGCGTAATGCTGAACTTGGGGACCGAAAAGGAAAATTCACATCCCGTTCCCGTG
CAAAATGTAACATGACGGGTGCCTAAAGCAAGAACCCACCGTGACGTACGGGAAAAAC
GCAAGTCACTGCTACTGTATCCTGACCACCAACACTCCTGTCTACCGAATATGGGA
GAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGATGCATAAGAAGGAAGTCGTGCTAACCGTG
CCGACTGAAGGGCTCGAGGTCACGTGGGGCAACAACGAGCCGTATAAGTATTGGCCGCAG
TTATCTACAAACGGTACAGCCCATGGCCACCCGCATGAGATAATTCTGTATTATTATGAG
CTGTACCCCACTATGACTGTAGTAGTTGTGTGTCAGTGGCCACGTTCACTCCTGTGCGATG
GTGGGTATGGCAGCGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATCACACCGTATGAA
CTGACACCAGGAGCTACCGTCCCTTTCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATCAGAACAGCT
AAAGCGGCCACATAACCAAGAGGCTGCGATATACCTGTGGAACGAGCAGCAACCTTTGTTT
TGGCTACAAGCCCTTATTCCGCTGGCAGCCCTGATTGTTCTATGCAACTGTCTGAGACTC
TTACCATGCTGCTGTAACCGTTGGCTTTTTAGCCGTAATGAGCGTCCGTGCCACACT
GTGAGCGGTACGAACACGTAACAGTGATCCCGAACACGGTGGGAGTACCGTATAAGACT
CTAGTCAATAGACCTGGCTACAGCCCATGGTATTGGAGATGGAACACTGTGTCAGTCACT
TTGGAGCCAACACTATCGCTTGATTACATCACGTGCGAGTACAAAACCGTCATCCCGTCT
CCGTACGTGAAGTGTGCGGTACAGCAGAGTGCAAGGACAAAAACCTACCTGACTACAGC
TGTAAGGTCTTACCAGCGTCTACCCATTTATGTGGGGCGGCGCCTACTGCTTCTGCGAC
GCTGAAAACACGCAGTTGAGCGAAGCACACGTGGAGAAGTCCGAATCATGAAAACAGAA
TTTGCATCAGCATAACAGGGTCCATACCGCATCTGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCCTTTAC
CAAGGAATAACATCACTGTAACCTGCCTATGCAAACGGCGACCATGCCGTACAGTTAAG
GACGCCAAATTCATTGTGGGGCCAATGTCTTACGCTGGACACCTTTTCGACAACAAAAT



GTGGTGTACAAAGGTGACGTCTATAACATGGACTACCCGCCCTTTGGCGCAGGAAGACCA
GGACAATTTGGCGATATCCAAAGTCGCACACCTGAGAGTAAAGACGTCTATGCTAATACA
CAACTGGTACTGCAGAGACCGGCTGTGGGTACGGTACACGTGCCATACTCTCAGGCACCA
TCTGGCTTTAAGTATTGGCTAAAAGAACGCGGGGCGTGCCTGCAGCACACAGCACCATTT
GGCTGCCAAATAGCAACAAACCCGGTAAGAGCGGTGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCC
ATCTCCATCGACATACCGGAAGCGGCCTTCACTAGGGTCGTGCAGCGGCCCTCTTTAACG
GACATGTCGTGCGAGGTACCAGCCTGCACCCATTCTCAGACTTTGGGGGCGTGCCCATT
ATTAATATGCAGCCAGCAAGAAAGGCAAGTGTGCGGTGCATTTCGATGACTAACGCCGTC
ACTATTCGGGAAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCAGCTGCAAATCTCTTTCTCG
ACGGCCTTAGCCAGCGCCGAATTCCGCGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACACTGTGCA
GCCGAGTGCCACCCCGGAAGGACCACATAGTCAACTACCCGGCGTCACATACCACCCTC
GGGGTCCAGGACATCTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTG
GGACTGGTTGTTGCTGTTGCCGCACTGATTCTAATCGTGGTGTATGCGTGTGCTTCAGC
AGGCACTAACTTGACAATTAAGTATGAAGGTATATGTGTCCCCTAAGAGACACACTGTAC
ATAGCAAATAATCTATAGATCAAAGGGCTACGCAACCCTGAATAGTAACAAAATACAAA
ATCACTAAAAATTATAAAAAACAGAAAAATACATAAATAGGTATACGTGTCCCCTAAGAGA
CACATTGTATGTAGGTGATAAGTATAGATCAAAGGGCCGAATAACCCCTGAATAGTAACA
AAATATGAAAATCAATAAAAAATCATAAAATAGAAAAACCATAAACAGAAGTAGTTCAAAG
GGCTATAAAACCCCTGAATAGTAACAAAACATAAAATTAATAAAAAATCAAATGAATACCA
TAATTGGCAAACGGAAGAGATGTAGGTACTTAAGCTTCCTAAAAGCAGCCGAACACTCACTT
TGAGAAGTAGGCATAGCATACCGAACTCTTCCACGATTCTCCGAACCCACAGGGACGTAG
GAGATGTTATTTTGTGTTTTAATTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGGCCGCT
TAATTAATCGAGGGGAATTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCAGGTGGCACTTTTCGGGGA
AATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC
ATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATT
CAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGT
CACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGT
TACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGCT
TTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGAC
GCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTAC
TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCT
GCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCG
AAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGG
GAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCA
ATGGCAACAACGTTGCGCAAATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAA
CAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTT
CCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATC
ATTGCAGCACTGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGG
AGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATT
AAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTT
CATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATC
CCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT
TCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTA
CCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGC
TTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCAC
TTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCT
GCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGAT
AAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACG
ACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAA
GGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGG
GAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGA
CTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGC
AACCGGAGCTCGTATGGACATATTGTCGTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTT
ATGTATCATACAAATCGATTTAGGTGACACTATAG

OMG (B) CHIK-RLuc

El vector CHIK-RLuc se ha descrito en Pohjala et al 2011 (adjuntado).



Secuencia completa del plásmido que codifica para el CHIK-Luc:

```
TACTAATACGACTCACTATAGATGGCTGCGTGAGACACACGTAGCCTACCAGTTTCTTACTGCTCTACTCTG
CAAAGCAAGAGATTAATAACCCATCATGGATCCTGTGTACGTGGACATAGACGCTGACAGCGCCTTTTTTGAA
GGCCCTGCAACGTGCGTACCCCATGTTTGAGGTGGAACCAAGGCAGGTCACACCGAATGACCATGCTAAT
GCTAGAGCGTTCTCGCATCTAGCTATAAACTAATAGAGCAGGAAATTGACCCGACTCAACCATCCTGGAT
ATCGGCAGTGCGCCAGCAAGGAGGATGATGTCGGACAGGAAGTACCACTGCGTCTGCCCGATGCGCAGTG
CGGAAGATCCCAGAGACTCGCCAATTATGCGAGAAAGCTAGCATCTGCCGCAGGAAAAGTCCTGGACAG
AAACATCTCTGGAAAGATCGGGGACTTACAAGCAGTAATGGCCGTGCCAGACACGGAGACGCCAACATTCT
GCTTACACACAGACGTCTCATGTAGACAGAGAGCAGACGTCGCTATATACCAAGACGTCTATGCTGTACAC
GCACCCACGTGCTATACCACCAGGCGATTAAGGGGTCCGAGTGGCGTACTGGGTTGGGTTGACACAA
CCCCGTTTATGTACAATGCCATGGCGGGTGCCTACCCCTCATACTCGACAACTGGGCAGATGAGCAGGTA
CTGAAGGCTAAGAACATAGGATTATGTTCAACAGACCTGACGGAAGGTAGACGAGGCAAGTTGTCTATTAT
GAGAGGGAAAAGCTAAAACCGTGCGACCGTGTGCTGTTCTCAGTAGGGTCAACGCTCTACCCGGAAAAGC
CGCAAGCTACTTAAGAGCTGGCACCTGCCATCGGTGTTCCATTTAAGGGCAAACCTCAGCTTACATGCCG
CTGTGATACAGTGGTTTCGTGTGAGGGCTACGTCGTTAAGAGAATAACGATGAGCCCAGGCCTTTATGGAA
```



AAACCACAGGGTATGCGGTAACCCACCACGCAGACGGATTCTGATGTGCAAGACTACCGACACGGTTGA
CGGCGAAAGAGTGTCAATTCTCGGTGTGCACATACGTGCCGGCGACCATTTGTGATCAAATGACCGGCATCC
TTGCTACAGAAGTCACGCCGGAGGATGCACAGAAGCTGTTGGTGGGGCTGAACCAGAGAATAGTGTTAA
CGGCAGAACGCAACGGAATACGAACACCATGAAAAATTATCTGCTTCCCCTGGTCCGCCAAGCCCTCAGTA
AGTGGGCAAAGGAGTGCCGAAAGACATGGAAGATGAAAACTCCTGGGGGTGAGAGAAAGAACTGAC
CTGCTGCTGTCTATGGGCATTCAAGAAGCAGAAAACACACACGGTCTACAAGAGGCCTGATACCCAGTCAA
TTCAGAAGGTTTCAGGCCGAGTTTGACAGCTTTGTGGTACCGAGTCTGTGGTCTGCCGGTTGTCAATCCCT
TTGAGGACTAGAATCAAATGGTTGTTAAGCAAGGTGCCAAAAACCGACCTGATCCCATACAGCGGAGACGC
CCGAGAAGCCCGGGACGCAGAAAAAGAAGCAGAGGAAGAAGCAGAAAGCAGAACTGACTCGCGAAGCCCT
ACCACCTCTACAGGCAGCACAGGAAGATGTTTCAGGTGCAAAATCGACGTGGAACAGCTTGAGGACAGAGCG
GGCGCAGGAATAATAGAGACTCCGAGAGGAGCTATCAAAGTTACTGCCCAACCAACAGACCACGTCTGG
GAGAGTACCTGGTACTCTCCCCGCAGACCGTACTACGTAGCCAGAAGCTCAGTCTGATTCACGCTTTGGCG
GAGCAAGTGAAGACGTGCACGCACAACGGACGAGCAGGGAGGTATGCGGTGCAAGCGTACGACGGCCGA
GTCCCTAGTGCCCTCAGGCTATGCAATCTCGCCTGAAGACTTCCAGAGTCTAAGCGAAAGCGCAACGATGGT
GTATAACGAAAGAGATTTCGTAACAGAAAGCTACACCATATTGCGATGCACGGACCAGCCCTGAACACCG
ACGAAGAGTCTGATGAGCTGGTGAAGGACAGAGAGGACAGAACAGCAGTACGTCTACGACGTGGATCAGAG
AAGATGCTGTAAGAAGGAAGAAGCCGACGACTGGTACTGGTGGGCGACTTGACTAATCCGCCCTACCAC
GAATTCGCATATGAAGGGCTAAAAATCCGCCCTGCCTGCCCATACAAAATTGCAGTCATAGGAGTCTTCGG
AGTACCGGGATCTGGCAAGTCAGCTATTATCAAGAACCCTAGTTACCAGGCAGGACCTGGTGACTAGCGGAA
AGAAAGAAAACCTGCCAAGAAATCACCACCGACGTGATGAGACAGAGAGGTCTAGAGATATCTGCACGTACG
GTTGACTCGCTGCTCTTGAATGGATGCAACAGACCAGTCGACGTGTTGTACGTAGACGAGGGCTTTGCGTG
CCACTCTGGAACGCTACTTGCTTTGATCGCCTTGGTGAGACCAAGGCAGAAAGTTGACTTTGTGGTGACC
CGAAGCAGTGCGGCTTCTTCAATATGATGCAGATGAAAGTCAACTATAATCACAACATCTGCACCCAAGTGT
ACCACAAAAGTATCTCCAGGCGGTGTACACTGCCTGTGACCGCCATTGTGTCATCGTTGCATTACGAAGGC
AAAATGCGCACTACGAATGAGTACAACAAGCCGATTGTAGTGGACACTACAGGCTCAACAAAACCTGACCC
TGGAGACCTCGTGTTAACGTGCTTCAGAGGGTGGGTTAACAACCTGCAAATTGACTATCGTGGATACGAGG
TCATGACAGCAGCCGCATCCCAAGGGTTAACAGAAAAGGAGTTTACGCAGTTAGACAAAAAGTTAATGAAA
ACCCGCTCTATGCATCAACGTGAGAGCACGTCAACGTACTCCTAACCGGTACGGAAGGTAACCTGGTATGG
AAGACACTTTCCGGCGACCCGTGGATAAAGACGCTGCAGAACCCACCGAAAGGAAACTTCAAAGCAACTAT
TAAGGAGTGGGAGGTGGAGCATGCATCAATAATGGCGGGCATCTGCAGTCACCAAATGACCTTCGATACAT
TCCAAAATAAAGCCAACGTTTGTGGGCTAAGAGCTTGGTCCCTATCCTCGAAACAGCGGGGATAAACTAA
ATGATAGGCAGTGGTCTCAGATAATTCAAGCCTTCAAAGAAGACAAAGCATACTCACCTGAAGTAGCCCTGA
ATGAAATATGTACGCGCATGTATGGGGTGGATCTAGACAGCGGGCTATTTTCTAAACCGTTGGTGTCTGTGT
ATTACGCGGATAACCACTGGGATAATAGGCCTGGAGGGAAAATGTTCCGATTTAACCCCGAGGCAGCATCC
ATTCTAGAAAGAAAGTATCCATTACAAAAGGGAAGTGGAAACATCAACAAGCAGATCTGCGTGACTACCAGG
AGGATAGAAGACTTTAACCCCTACCACCAACATCATACCGGCCAACAGGAGACTACCACACTCATTAGTGGC
CGAACACCGCCCAGTAAAAGGGGAAAGAATGGAATGGTGGTTAACAAGATAAACCGGCCACCACGTGCTC
CTGGTCAGTGGCTATAACCTTGACTGCTACTAAGAGAGTCACTTGGGTAGCGCCGTTAGGTGTCCGCGG
AGCGGACTACACATAACCTAGAGTTGGGTCTGCGAGCAACGCTTGGTAGGTATGACCTAGTTGGTGCATAA
ACATCCACACACCTTTTCGCATACACCATTACCAACAGTGCGTCGACCACGCAATGAAACTGCAAATGCTCG
GGGGTGACTCATTGAGACTGCTCAAACCGGGCGGCTCTCTATTGATCAGAGCATATGGTTACGCAGATAGA
ACCAGTGAACGAGTCATCTGCGTATTGGGACGCAAGTTTAGATCGTCTAGAGCGTTGAAACCACCATGTGT
CACCAGCAACACTGAGATGTTTTTCTATTACGCAACTTTGACAATGGCAGAAGGAATTTCACAACTCATGT
CATGAACAATCAACTGAATGCAGCCTTCGTAGGACAGGTCACCCGAGCAGGATGTGCACCGTCGTACCGG
GTAACACGCATGGACATCGCGAAGAACGATGAAGAGTGCGTAGTCAACGCCGCTAACCCTCGCGGGTTAC
CGGGTGACGGTGTGTTGCAAGGCAGTATACAAAAAATGGCCGGAGTCTTTAAGAACAGTGCAACACCAGTG
GGAACCGCAAAAACAGTTATGTGCGGTACGTATCCAGTAATCCACGCTGTTGGACCAAACCTTCTAATTAT
TCGGAGTCTGAAGGGGACCGGGAATTGGCAGCTGCCTATCGAGAAGTGCAGAAAGGAAGTAACTAGGCTGG
GAGTAAATAGTGTAGCTATACCTCTCCTCTCCACAGGTGTATACTCAGGAGGGAAAGACAGGCTGACCCAG
TCACTGAACCACCTCTTTACAGCCATGGACTCGACGGATGCAGACGTGGTCATCTACTGCCGCGACAAAGA
ATGGGAGAAGAAAATATCTGAGGCCATACAGATGCGGACCCAAGTAGAGCTGCTGGATGAGCACATCTCCA
TAGACTGCGATATTGTTCCGCTGCACCCTGACAGCAGCTTGGCAGGCAGAAAAGGATACAGCACCACGGA
AGGCGCACTGACTCATATCTAGAAGGGACCCGTTTTATCAGACGGCTGTGGATATGGCGGAGATACATA
CTATGTGGCCAAAGCAAACAGAGGCCAATGAGCAAGTCTGCCTATATGCCCTGGGGGAAAGTATTGAATCG
ATCAGGCAGAAATGCCCGGTGGATGATGCAGACGCATCATCTCCCCCAAACCTGTCCCGTGCCTTTGCCG
TTACGCTATGACTCCAGAACGCGTCACCCGGCTTCGCATGAACCACGTCAACAAGCATAATTGTGTGTTCTTC
GTTTCCCCTCCCAAAGTACAAAATAGAAGGAGTGCAAAAAGTCAAATGCTCTAAGGTAATGCTATTTGACCA



CAACGTGCCATCGCGCGTAAGTCCAAGGGAATATAGATCTTCCCAGGAGTCTGCACAGGAGGCGAGTACA
ATCACGTCACTGACGCATAGTCAATTCGACCTAAGCGTTGATGGCGAGATACTGCCCGTCTCGTCAGACCT
GGATGCTGACGCCCCAGCCCTAGAACCAGCACTAGACGACGGGGCGACACACACGCTGCCATCCACAACC
GGAAACCTTGCGGCCGTGTCTGATTGGTAATGAGCACCGTACCTGTGCGCGCCGCCAGAAGAAGGCGAG
GGAGAAACCTGACTGTGACATGTGACGAGAGAGAAGGGAATATAACACCCATGGCTAGCGTCCGATTCTTT
AGGGCAGAGCTGTGTCCGGTCTGACAAAGAAACAGCGGAGACGCGTGACACAGCAATGTCTCTTCAGGCAC
CACCGAGTACCGCCACGGAACCGAATCATCCGCCGATCTCCTTCGGAGCATCAAGCGAGACGTTCCCCATT
ACATTTGGGGACTTCAACGAAGGAGAAATCGAAAGCTTGATGGAAGACGCCAAAACATAAAGAAAGGCC
GGCGCCATTCTATCCTCTAGAGGATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCC
TGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGAACATCACGTACGCGGAATACTTCGAAA
TGTCCGTTCCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGT
GAAACTCTCTTCAATCTTTATGCCGGTGTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCCGCGAAC
GACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGAACATTTGCGAGCCTACCGTAGTGTGTTTCCAAAA
AGGGGTTGCAAAAAATTTGAACGTGCAAAAAAATTACCAATAATCCAGAAAATTATTATCATGGATTCTAA
AACGGATTACCAGGATTTTCAGTCGATGTACACGTTTCGTACGTCCTCATCTACCTCCCGTTTTAATGAATA
CGATTTTGTACCAGAGTCTTTGATCGTGACAAAACAATTGCACGTGATAATGAATTCCTCTGGGTCTACTGG
GTTACCTAAGGGTGTGGCCCTTCCGCATAGAACTGCCTGCGTCAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTT
TGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACT
ACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTTTACGAT
CCCTTCAGGATTACAAAATTCAAAGTGCCTTGTAGTACCAACCCTATTTTCATTCTTCGCCAAAAGCACTCT
GATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGGGCGCACCTCTTTCGAAAGAAGTCGG
GGAAGCGGTTGCAAAACGCTTCCATCTTCCAGGGATACGACAAGGATATGGGCTCACTGAGACTACATCAG
CTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTCCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCG
AAGGTTGTGGATCTGGATACCGGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAGAGAGGCGAATTATGTGTCAGAGGAC
CTATGATTATGTCCGTTATGTAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTAC
ATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATAGTTGACCGCTTGAAGTCTTTAATTA
AATACAAAGGATATCAGGTGGCCCCGCTGAATTGGAATCGATATTGTTACAACACCCCAACATCTTCGACG
CGGGCGTGGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCGTTGTTGTTTTGGAGCACGG
AAAGACGATGACGGAAAAGAGATCGTGGATTACGTGCGCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAGTTGCGCG
GAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAAGTCTTACCGGAAAACCTCGACGCAAGAAAATCAGAGAG
ATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGCTTCTGAGCTACTAACTTTCCGGAGACTTCTTA
CCAGGAGAAGTGGATGACTTGACAGACAGCGACTGGTCCACGTGCTCAGACACGGACGACGAGTTATGAC
TAGACAGGGCAGGTGGGTATATATTCTCGTCGGACACCGGTCCAGGTCATTTACAACAGAAGTCAGTACGC
CAGTCAGTGTGCCGGTGAACACCCTGGAGGAAGTCCACGAGGAGAAGTGTACCCACCTAAGCTGGATG
AAGCAAAGGAGCAACTATTACTTAAGAACTCCAGGAGAGTGCATCCATGGCCAACAGAAGCAGGTATCAG
TCGCGCAAAGTAGAAAACATGAAAGCAGCAATCATCCAGAGACTAAGAGAGGGCTGTAGACTATACTTAATG
TCAGAGACCCCAAAAGTCCCTACTTACCGGACTACATATCCGGCGCCTGTGTACTCGCCTCCGATCAACGT
CCGATTGTCCAATCCGAGTCCGAGTGGCAGCATGCAATGAGTTCTTAGCTAGAAGACTTCCAACGTGCTC
ATCATAACCAATTACCGACGAGTATGTCATATCTAGACATGGTGGACGGGTCCGAGATGTTCCCTGGACC
GAGCGACATTCAATCCGTCAAAACTCAGGAGCTACCCGAAACAGCACGCTTACCACGCGCCCTCCATCAGA
AGCGCTGTACCGTCCCCATTCCAGAACACACTACAGAATGACTGGCAGCAGCCACGAAAAGAACTGCAA
CGTCACACAGATGAGGGAATTACCCACTTTGGACTCAGCAGTATTCAACGTGGAGTGTTTTCAAAAAATTCGC
ATGCAACCAAGAATACTGGGAAGAATTTGCTGCCAGCCCTATTAGGATAACAACCTGAGAATTTAGCAACCTA
TGTTACTAACTAAAAGGGCCAAAAGCAGCAGCGCTATTCGCAAAAACCCATAATCTACTGCCACTACAGGA
AGTACCAATGGATAGGTTACAGTAGATATGAAAAGGGACGTAAGGTGACTCCTGGTACAAAGCATAACAG
AGGAAAGACCTAAGGTGCAGGTTATACAGGCGGCTGAACCCTTGGCGACAGCATACTATGTGGGATTAC
AGAGAGCTGGTTAGGAGGCTGAACGCCGTCTCCTACCCAATGTACATACTATTTGACATGTCTGCCGA
GGATTTGATGCCATCATAGCCGCACACTTAAAGCCAGGAGACTGTTTTGAAACGGACATAGCCTCCTT
TGATAAGAGCCAAGATGATTCACCTTGCCTTACTGCTTTGATGCTGTTAGAGGATTTAGGGGTGGATCACTC
CCTGCTGGACTTGATAGAGGCTGCTTTCCGAGAGATTTCCAGCTGTCACCTACCGACAGGTACGCGCTTCA
AGTTCCGGCGCCATGATGAAATCAGGTATGTTTCTAACTCTGTTTCGTCAACACATTGTTAAACATCACCATCG
CCAGCCGAGTGTGGAAGATCGTCTGACAAAATCCGCGTGCAGCGCCTTCATCGGCGACGACAACATAAT
ACATGGAGTCGTCTCCGATGAATTGATGGCAGCCAGATGTGCCACTTGGATGAACATGGAAGTGAAGATCA
TAGATGCAGTTGTATCCTTGAAGGCCCTTACTTTTGTGGAGGGTTTACTGCACGATACTGTGACAGGAA
CAGCTTGCAGAGTGGCAGACCCGCTAAAAGGCTTTTTAACTGGGCAAACCGCTAGCGGCAGGTGACGA
ACAAGATGAAGATAGAAGACGAGCGCTGGCTGACGAAGTGTGATCAGATGGCAACGAACAGGGCTAATTGAT
GAGCTGGAGAAAGCGGTATACTCTAGGTACGAAGTGCAGGGTATATCAGTTGTGGTAATGTCCATGGCCAC



CTTTGCAAGCTCCAGATCCAACCTTCGAGAAGCTCAGAGGACCCGTCATAACTTTGTACGGCGGTCTAAATA
GGTACGCACTACAGCTACCTATTTTGCAGAAGCCGACAGCAAGTATCTAAACACTAATCAGCTACAATGGAG
TTCATCCCAACCCAAACTTTTTACAATAGGAGGTACCAGCCTCGACCCTGGACTCCGCGCCCTACTATCCAA
GTCATCAGGCCAGACCCGCGCCCTCAGAGGCAAGCTGGGCAACTTGCCAGCTGATCTCAGCAGTTAATA
AACTGACAATGCGCGCGGTACCCCAACAGAAGCCACGCAGGAATCGGAAGAATAAGAAGCAAAAGCAAAA
ACAACAGGCGCCACAAAACAACACAAATCAAAGAAAGCAGCCACCTAAAAAGAAACCGGCTCAAAAGAAAA
AGAAGCCGGGCGCAGAGAGAGGATGTGCATGAAAATCGAAAATGATTGTATTTTGAAGTCAAGCACGAA
GGTAAGGTAACAGGTTACGCGTGCCTGGTGGGGGACAAAGTAATGAAACCAGCACACGTAAGGGGGACCA
TCGATAACGCGGACCTGGCCAAACTGGCCTTTAAGCGGTATCTAAGTATGACCTTGAATGCGCGCAGATA
CCCGTGACATGAAGTCCGACGCTTCGAAGTTCACCCATGAGAACTGGAGGGGTACTACAACCTGGCACCA
CGGAGCAGTACAGTACTCAGGAGGCCGGTTCACCATCCCTACAGGTGCTGGCAAACCAGGGGACAGTGGC
AGACCGATCTTCGACAACAAGGGACGCGTGGTGGCCATAGTCTTAGGAGGAGCTAATGAAGGAGCCCGTA
CAGCCCTCTCGGTGGTACCTGGAATAAAGACATTGTCACTAAAATCACCCCGAGGGGGCCGAAGAGTG
GAGTCTTGCCATCCAGTTATGTGCCTGTTGGCAAACACCACGTTCCCCTGCTCCCAGCCCCCTTGCACGC
CCTGCTGCTACGAAAAGGAACCCGGAGGAAACCCTACGCATGCTTGAGGACAACGTCATGAGACCTGGTA
CTATCAGCTGCTACAAGCATCCTTAACATGTTCTCCCACCCGACGACGACGACCAAGGACAACCTTCA
ATGTCTATAAAGCCACAAGACCATACTTAGCTCACTGTCCCAGACTGTGGAGAAGGGCACTCGTGCCATAGT
CCCCTAGCACTAGAACGCATCAGAAATGAAGCGACAGACGGGACGCTGAAAATCCAGGTCTCCTTGCAAAT
CGGAATAAAGACGGATGACAGCCACGATTGGACCAAGCTGCGTTATATGGACAACCACATGCCAGCAGAC
GCAGAGAGGGCGGGGCTATTTGTAAGAACATCAGCACCGTGTACGATTACTGGAACAATGGGACACTTCAT
CCTGGCCCCGATGTCCAAAAGGGGAACTCTGACGGTGGGATTACTGACAGTAGGAAGATTAGTCACTCAT
GTACGCACCCATTTACCACGACCCTCCTGTGATAGGTGCGGAAAAATTCCATTCGCGACCCGACGACGGT
AAAGAGCTACCTTGACGACGTCAGTGCAGAGCACCGCCGCAACTACCGAGGAGATAGAGGTACACATGC
CCCCAGACACCCCTGATCGCACATTAATGTCACAACAGTCCGGCAACGTAAGATCACAGTCAATGGCCAG
ACGGTGCAGTACAAGTGAATTGCGGTGGCTCAAATGAAGGACTAACAACTACAGACAAAGTGATTAATAAC
TGCAAGGTTGATCAATGTCATGCCGCGGTACCAATCACAAAAAGTGGCAGTATAACTCCCCTCTGGTCCC
GCGTAATGCTGAACTTGGGGACCGAAAAGGAAAAATTACATCCCGTTTCCGCTGGCAAATGTAACATGCA
GGGTGCCTAAAGCAAGGAACCCACCGTGACGTACGGGAAAAACCAAGTCATCATGCTACTGTATCCTGAC
CACCCAACACTCCTGTCCCTACCGGAATATGGGAGAAGAACCAAACTATCAAGAAGAGTGGGTGATGCATAA
GAAGGAAGTCGTGCTAACCCTGCCGACTGAAGGGCTCGAGGTCACGTGGGGCAACAACGAGCCGTATAAG
TATTGGCCGCAGTTATCTACAAACGGTACAGCCCATGGCCACCCGCATGAGATAATTCTGTATTATTATGAG
CTGTACCCCACTATGACTGTAGTAGTTGTGTCAGTGGCCACGTTCCATACTCCTGTGATGGTGGGTATGGC
AGCGGGGATGTGCATGTGTGCACGACGCAGATGCATCACACCGTATGAACTGACACCAGGAGCTACCGTC
CCTTTCTGCTTAGCCTAATATGCTGCATCAGAACAGCTAAAGCGGCCACATACCAAGAGGCTGCGATATA
CTGTGGAACGAGCAGCAACCTTTGTTTTGGCTACAAGCCCTTATTCCGCTGGCAGCCCTGATTGTTCTATGC
AACTGTCTGAGACTCTTACCATGCTGCTGTAACCGTTGGCTTTTTAGCCGTAATGAGCGTCGGTGCCAC
ACTGTGAGCGGTACGAACACGTAACAGTATCCCGAACACGTTGGGAGTACCGTATAAGACTCTAGTCAA
TAGACTGGCTACAGCCCCATGTTATTGGAGATGGAACACTGTCAGTCACTTTGGACCAACACTATCGC
TTGATTACACTCAGTGCGAGTACAAAACCGTATCCCGTCTCCGTACGTGAAGTGTGCGGTACAGCAGAG
TGCAAGGACAAAAACCTACCTGACTACAGCTGTAAGGTCTTACCAGCGTCTACCCATTTATGTGGGGCGG
CGCCTACTGCTTCTGCGACGCTGAAAACACGCAGTTGAGCGAAGCACACGTGGAGAAGTCCGAATCATGC
AAAACAGAATTTGCATCAGCATAACAGGGCTCATACCGCATCTGCATCAGCTAAGCTCCGCGTCTTTACCAA
GGAAATAACATCACTGTAACCTGCCTATGCAAACGGCGACCATGCCGTACAGTAAAGGACGCCAAATTCATT
GTGGGGCCAATGTCTTCAGCCTGGACACCTTTGACAACAAAATTGTGGTGTACAAAGGTGACGTCTATAA
CATGGACTACCCGCCCTTTGGCGCAGGAAGACCAGGACAATTTGGCGATATCCAAAGTCGCACACCTGAGA
GTAAGACGTCTATGCTAATACAACTGGTACTGCAGAGACCGGCTGTGGGTACGGTACACGTGCCATAC
TCTCAGGCACCATCTGGCTTTAAGTATTGGCTAAAAGAACGCGGGGCGTCTGCTGCAGCACACAGCACCATT
TGGCTGCCAAATAGCAACAACCCGGTAAGAGCGGTGAACTGCGCCGTAGGGAACATGCCCATCTCCATC
GACATACCGGAAGCGGCCCTTACTAGGGTCTGTCGACGCGCCCTCTTTAACGGACATGTCGTGCGAGGTAC
CAGCCTGCACCCATTCTCAGACTTTGGGGGCGTGCCTATTATAATATGCAGCCAGCAAGAAAGGCAAG
TGTGCGGTGCATTGATGACTAACGCCGTACTATTCCGGAAGCTGAGATAGAAGTTGAAGGGAATTCTCA
GCTGCAAATCTTTTCTCGACGGCCTTAGCCAGCGCCGAATTCGCGGTACAAGTCTGTTCTACACAAGTACA
CTGTGCAGCCGAGTGCCACCCCCGAAGGACCACATAGTCAACTACCCGGCGTACATACCACCCTCGGG
GTCCAGGACATCTCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCAGAAGATCACGGGAGGTGTGGGACTGGTTGTTG
CTGTTGCCGCACTGATTCTAATCGTGGTGTGCTATGCGTGTGTTTACGACAGGCACTAATTGACAATTAAGTAT
GAAGGTATATGTGTCCCCTAAGAGACACACTGTACATAGCAAATAATCTATAGATCAAAGGGCTACGCAACC
CCTGAATAGTAACAAAATACAAAATCACTAAAAATTAAAAACAGAAAAATACATAAATAGGTATACGTGTCC



CCTAAGAGACACATTGTATGTAGGTGATAAGTATAATCAAAGGGCCGAATAACCCCTGAATAGTAACAAAAT
ATGAAAATCAATAAAAATCATAAAATAGAAAACCATAAACAGAAGTAGTTCAAAGGGCTATAAAACCCCTGA
ATAGTAACAAAACATAAAAATTAATAAAAATCAAATGAATACCATAATTGGCAAACGGAAGAGATGTAGGTAC
TTAAGCTTCCTAAAAGCAGCCGAACCTCACTTTGAGAAGTAGGCATAGCATAACCGAACTCTTCCACGATTCTC
CGAACCCACAGGGACGTAGGAGATGTTATTTTGTTTTAAATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCG
GCCGCAATGAACGAATTCAAGCTTGATATCATTCAAGACGAGCCTCAGACTCCAGCGTAACTGGACTGCAA
TCAACTCACTGGCTCACCTTCACGGGTGGGCCCTTCTCGGTAGAAAATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTT
TTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCAGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGATC
AAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGT
GTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTT
ACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA
AGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCG
AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTA
TCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCAGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCT
TTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCATCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGA
GCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCAGAAAGGCCACCCGAAGGTGAGCCAGGTGATTACATTTGGGCC
TCATCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCAGGCAGCTGCGGTAAGCTCATCAGCGTGGTCTG
GAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCATCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCT
GGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTCTGTTTGGTCATTTAGAAAACTCATCGAGCA
TCAAGTGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAA
GGAGAAAACCTACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCC
AACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACG
ACTGAATCCGGTGAGAAATGGCAAAGCTTATGCATTTCTTCCAGACTTGTTC AACAGGCCAGCCATTACGC
TCGTATCAAAAATCACTCGCACCAACCAACCGTTATTCATTCTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACG
CGATCGCCGTTAAAAGGACAATTACAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATC
ACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCTGGGATCGCAGTGGTG
AGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCA
GTTTAGCCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGG
CGCATCGGGCTTCCATACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATA
CCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCT
CATTTTAGCTTCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTCATTAT
GGTGAAGTTGGAACCTTTACGTGCCGATCAAGTCAAAGCCTCCGGTCGGAGGCTTTTGACTTTCTGCT
ATGGAGGTCAGGTATGATTTAAATGGTCAGTATTGAGCGATATCTAGAGAATTCGTC

- d. Gama de hospedadores del vector: bacteria.
- e. Características de la movilidad del vector: no procede.
 - 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?

5) Información del inserto:

- a) Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia: ver apartado V4.
- b) Origen y función específica de cada parte del inserto: ver apartados V4 y V5.
- c) Descripción del método utilizado para la transformación: ver apartados V4 y V5.
- d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto: ver apartados V4 y V5.
- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto: ver apartados V4 y V5.
- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?:



- g) ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese.
- h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.

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):

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

Aportar toda la documentación al respecto. Se adjuntan los artículos científicos de los grupos que han generado los OMG. Ver: Pohjala et al 2011 (**CHIK-RLuc**) y Konstantin et al 2006 (**CHIKV-LR 5_GFP**) adjuntados.

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

- a) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese: No.
- b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese: No.
- c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar: 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 procede.
 - e) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? En caso afirmativo, especifíquese: No.
 - f) Marcadores específicos del OMG: El gen de la luciferasa firefly.
- 3) Estabilidad genética del OMG (Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones):
- El OMG es estable en cultivos celulares. De todas formas existe una probabilidad baja de pérdida del inserto durante el proceso de replicación celular.
- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos:
- Nula. El inserto no tiene capacidad autónoma de transferirse.
- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.
- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: Técnicas de biología molecular: detección de luciferasa, detección de ARN viral mediante qPCR, etc.
 - b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: No procede.

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: < 1.0L / día.
 - b) Número de plantas: No procede.
 - c) Número de animales: No procede.
- 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):
- Tiempo indefinido.
- 4) Finalidad de la actividad de utilización confinada, incluidos los resultados esperados:
- Introducción transitoria del genoma viral del CHIKV a través de la transfección de su material genético en cultivos celulares para investigar el efecto del CHIKV en células humanas en condiciones normales y bajo el agregado de sustancias químicas y otras. Se cuantifica la replicación viral mediante la medición de los genes introducidos de luciferasa y/o la proteína fluorescente verde (GFP).
- 5) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa (señalar nombre y ubicación), y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG:



El vector que codifica y expresa el OMG para el **CHIKV-LR 5_GFP** fue provisto sin restricciones por Dr. Olivier Schwartz, Institute Pasteur, Paris, Francia. El vector que codifica y expresa el OMG **CHIK-RLuc** procede del laboratorio de la Dra. Barbara Schnierle (Investigadora Principal del grupo "AIDS, New and Emerging Pathogens", Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Alemania).

- 6) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo en virtud de la legislación aplicable¹ (tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

Los plásmidos que codifican para los OMG's se envían desde Alemania en un paquete que contiene viales con DNA plasmídico. El envío se hace a una temperatura de 4°C y se envían mediante la compañía FeDEX con la documentación adecuada indicando su contenido biológico y su no peligrosidad (el plásmido que contenía la secuencia parcial del virus).

- 7) Descripción de los métodos de manejo de los OMG (incluyendo descripción de las fases de cultivo y concentración máxima de OMG en el cultivo):

El ARN del CHIKV se obtiene mediante la transcripción in vitro del plásmido OMG. Una vez obtenida la molécula de ARN, esta se transfecta mediante electroporación a las células diana susceptibles a la infección por el CHIKV. Cuando sea necesario las células se lisan y se evalúa la actividad luciferasa o de la GFP, que equivale a medir la actividad viral.

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

El laboratorio de contención 309.02 cuenta con las medidas de acción preventiva propias del nivel 3 de contención biológica, de acuerdo con el anexo IV al Real Decreto 664/1997, de 12 de Mayo, sobre Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.

La gestión de residuos se basa en el Manual de Residuos del Parque de Investigación Biomédica de Barcelona (ver Anexo XV) y se lleva a cabo por la empresa especializada CESPA.

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

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

Se adjunta croquis de situación (ver Anexo XVI) y plano 1:5.000: (ver Anexo XVII).

- 2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

¹ Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- Reglamento (CE) N° 1946/2003, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente. El formulario necesario para acompañar a los OMG en el transporte, puede encontrarse en el siguiente enlace: (<http://www.biodiv.org/biosafety/cop-mop/result.aspx?id=8288&lg=1>)
- Normativa nacional e internacional (OACI/IATA, OMI/MDG, TPF/RID y TPD/ADR) para el transporte de mercancías peligrosas y, en particular, de sustancias infecciosas y muestras para diagnóstico.



El clima en Barcelona es Mediterráneo, del tipo bajo central. La precipitación mediana anual está alrededor de los 600mm, siendo los valores más elevados cerca de la cordillera del litoral. La estación lluviosa al año, es el otoño, seguida de la primavera, y la seca el verano sobre todo en julio. Con respecto a las temperaturas, los inviernos son suaves, con medias de 9°C a 11°C, las temperaturas son más bajas en las zonas próximas a Besós y a la Zona Franca donde las mínimas son más frías y los veranos calurosos, entre los 23°C y 24°C por término medio, comportando una amplitud térmica anual moderada. Casi nunca hiela en el centro de Barcelona.

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:

El laboratorio donde se manipularán los organismos es el laboratorio de contención 309.02, que cuenta con las medidas de acción preventiva propias del nivel 3 de contención biológica, de acuerdo con el anexo IV al Real Decreto 664/1997, de 12 de Mayo, sobre Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

El personal que trabaja en la zona de utilización confinada de organismos genéticamente modificados dispone de una norma de prevención y de una colección de instrucciones básicas de uso del laboratorio de contención. Correspondiendo, respectivamente, a los Anexos:

Anexo III: Manual de Bioseguridad.

Anexo IV: instrucción básica para utilizar el laboratorio de contención 309.02.

Anexo V: Instrucción básica para entrar y salir del laboratorio de contención 309.02.

Anexo VI: instrucción básica para actuar en emergencias en el laboratorio de contención 309.02.

2) Formación del personal adscrito:

El edificio Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona dispone de un Plan de autoprotección. El responsable de su elaboración e implantación es el Consorci Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, como titular del edificio. Desde el año 2007, se difunden dos veces al año, con motivo del simulacro de emergencia y en el período vacacional de verano, unas normas básicas de autoprotección. También están disponibles en la intranet de la Universidad. Se adjuntan como Anexo:

Anexo XII: Informe de análisis de los riesgos y de las condiciones de protección del laboratorio de nivel 3 de contención biológica ubicado en el edificio PRBB (Barcelona).

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:



El personal que trabaja en la zona de utilización confinada de organismos genéticamente modificados dispone de una norma de prevención que contiene sub-apartados específicos con el procedimiento de limpieza de los principales equipos de trabajo.

Anexo III: Manual de Bioseguridad (apartado 4.5.2.7.6: pautas específicas de actuación con equipos de trabajo).

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

La Universidad Pompeu Fabra tiene repartidos el mantenimiento de las salas de contención biológica y el resto de laboratorios de la forma siguiente:

El mantenimiento de las instalaciones troncales, electricidad, climatización (incluidos filtros Hepa), datos, detección de incendios, agua, desguaces, etc. lo tiene delegado al gestor del edificio Parque de Investigación Biomédica de Barcelona (PRBB) al formar parte del edificio, pagando este servicio conjuntamente con el alquiler. El PRBB tiene contratado para este trabajo a la empresa Veolia.

El mantenimiento del equipamiento científico está contratado a la empresa TBS, complementado con los contratos de mantenimiento específicos del equipamiento especial (Matachana y Telsar), con los fabricantes del equipo.

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Estudio inicial de comprobación de la estanqueidad del laboratorio de contención (Anexo XIII-A / B) i seguimiento periódico y certificado de la eficacia de los filtros HEPA de las cabinas de bioseguridad (Anexo XIV).

X.- GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1) Encargado de la gestión de residuos:

Gestión interna:	SÍ	<input type="checkbox"/>	NO	<input checked="" type="checkbox"/>
Gestión por una empresa externa:	SÍ	<input checked="" type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>

Si es el caso, nombre de la empresa externa encargada de la gestión de los residuos:

Cespa Gestión de Residuos, S.A.

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

Los residuos infecciosos y no infecciosos generados en el laboratorio de contención son residuos sanitarios específicos del grupo III.

Para la eliminación de residuos líquidos, mediante decantación, y de pequeños residuos sólidos que han estado en contacto con material infeccioso, es necesario:

- Decantar los residuos en el recipiente de plástico autoclavable, ubicado en el interior de las cabinas de seguridad biológica.



- Inactivar el contenido con Perasafe al 1%.
- Introducir las pipetas Pasteur o calibradas, puntas de pipeta, tubos Eppendorf o tubos Sarsted y demás material pequeño en los recipientes de decantación de las cabinas.

Las pipetas largas deberán lavarse (aspirante y liberando) con la dilución de Perasafe, como mínimo dos veces antes de ser descartadas dentro del recipiente.

Los tubos pequeños, después de eliminar el líquido de su interior, se introducirán abiertos en el recipiente de decantación.

Este material se dejará inactivar durante 8 h dentro de la cabina.

- No superar con los residuos sólidos el nivel de líquido que hay dentro del recipiente de decantación.
- Sustituir el recipiente de decantación cuando se llene en dos tercios de su capacidad.
- Cerrar el recipiente y autoclavarlo.

El material plástico de mayor volumen se eliminará en función de su estanqueidad. Las placas y frascos se descontaminarán poniendo Perasafe al 1% en los pozos de las placas y los frascos, y dejándoles un mínimo de 8 horas en la cabina u otros recipientes que por sí mismos cierren herméticamente. Todos los contenedores de residuos deben estar rotulados con el nombre del usuario, contenido y fecha. Al día siguiente habrá que tirar el material al contenedor específico de residuos sólidos (negro con tapa amarilla).

Los objetos punzantes y/o cortantes se utilizarán únicamente en los casos en que sea estrictamente necesario, y tendrán recipientes especiales situados en el interior de las cabinas (amarillo con tapa roja).

Los contenedores específicos se cerrarán y se autoclavarán.

Los papeles de pipetas u otros papeles no contaminados se depositarán en la papelera, que contendrá una doble bolsa, la externa de autoclave y la interna de residuos urbanos. Nunca se llenará más de la mitad de su capacidad, para que puedan ser manipuladas con seguridad. Ambas bolsas tendrán que cerrarse antes de autoclavarlas, minimizando su manipulación, y poner cinta indicadora de esterilización en su exterior.

Todo el material sólido o líquido de rechazo, aunque ya no sea estrictamente infeccioso, debe salir de la zona de contención convenientemente autoclavado.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

La causa más probable es por derramamiento de un cultivo que contenga el OMG. Si éste se produce en el interior de la cabina se deben seguir las recomendaciones previstas en el protocolo de trabajo en cabina. Si se produjera fuera de la cabina se deben de seguir las recomendaciones de seguridad del protocolo de trabajo de la P3.



En otro tipo de accidentes que se puedan producir, como por ejemplo un incendio en el interior de la sala de cultivos, el OMG no tendría ningún efecto en la salud humana o el medio ambiente ya que no se liberaría al exterior sino que quedaría destruido.

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

La zona de utilización confinada de organismos genéticamente modificados dispone de un botiquín portátil de primeros auxilios, dotados de acuerdo a lo establecido en el anexo VI del Real Decreto 486/1997, de 14 de Abril, sobre disposiciones mínimas de Seguridad y Salud en los Lugares de Trabajo.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

El personal que trabaja en la zona de utilización confinada de organismos genéticamente modificados dispone de una norma de prevención que contiene un capítulo específico sobre medidas de emergencia donde se detallan; protocolo de actuación en caso de vertido de agentes biológicos, protocolo de actuación en caso de contacto accidental y protocolo de gestión interna y de notificación de accidentes e incidentes, así como una instrucción básica de actuación.

Anexo III: Manual de Bioseguridad.

Anexo VI: instrucción básica para actuar en emergencias en el laboratorio de contención 309.02.

4) Planes de emergencia:

El protocolo de actuación en caso de contacto accidental se ha coordinado con el Servicio de Prevención de Riesgos Laborales del Parc de Salut Mar de Barcelona, y con los servicios asistenciales de la Mutua de Accidentes de Trabajo y Enfermedades Profesionales, a la que la UPF se ha asociado.

Anexo III: Manual de Bioseguridad.



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

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

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

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

1) Entidad

Nombre: Universitat Pompeu Fabra (UPF)
Dirección postal: Dr. Aiguader, 88 – 08003 Barcelona

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Jaume Casals Pons
NIF: 37317474-C
Cargo: Rector
Tel: 93 542 20 00
Fax: 93 542 20 02
Correo electrónico: rector@upf.edu

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Juana Díez Antón
NIF: 74181228-H
Cargo: Investigadora Principal del Grupo de Virología Molecular, Coordinadora de la Unidad de Virología, Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universitat Pompeu Fabra
Tel: 93 316 08 62
Fax: 93 316 09 01
Correo electrónico: juana.diez@upf.edu

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

Nombre y apellidos: Andreas Franz Meyerhans
NIF: Y-0810274-K
Cargo: Responsable del laboratorio de contención 62.309.02 con nivel de seguridad biológica de nivel 3
Tel: 93 316 08 31
Fax: 93 316 09 01
Correo electrónico: andreas.meyerhans@upf.edu



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

El responsable de bioseguridad de la instalación actúa como persona de contacto.

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

1. Objetivo de la actividad:

Nombre OMG: **CHIK-Luc y pCHIKV-118-GFP**

Introducción transitoria del genoma viral del CHIKV a través de la transfección de su material genético en cultivos celulares para investigar el efecto del CHIKV en células humanas en condiciones normales y bajo el agregado de sustancias químicas y otras. Se cuantifica la replicación viral mediante la medición de los genes introducidos de luciferasa y/o la proteína fluorescente verde (GFP)

2. Duración prevista de la actividad:

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

Indeterminada.

III. EVALUACIÓN DE RIESGO

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

1. Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del:
Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto.

- a) Organismo receptor. Virus del chikungunya (CHIKV)
- b) Organismo donante. *Aequorea victoria* y *Renilla reniformis*
- c) Inserto. Genes de la *Renilla* luciferasa y de la proteína fluorescente verde (GFP)
- d) Vector. Ver Konstantin et al 2006 y el documento MTA adjuntados.
- e) Organismo modificado genéticamente resultante. Plásmidos que codifican para el CHIKV y que expresan el gen de la *renilla* luciferasa (**CHIK-Luc**) o el de la GFP (**pCHIKV-118-GFP**)
- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal. El OMG es infeccioso para las personas. Ver Formulario A para más detalles.
- g) Efectos para el medio ambiente. No procede

2. Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

Para establecer esta primera valoración se tendrá en cuenta lo dispuesto en el artículo 4 de la Directiva 2009/41/CE y, en caso de ser aplicable, otros sistemas de clasificación nacionales e internacionales existentes (por ejemplo, la Directiva 2000/54/CE sobre protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo).

Tipo 1



Tipo 2
Tipo 3
Tipo 4

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

a) Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental): las actividades se desarrollan en el correspondiente laboratorio de seguridad de nivel 3 de acuerdo a los protocolos establecidos (ver apartado 5).

b) Concentración y escala utilizadas: el título del OMG varía de acuerdo a la eficiencia de producción. Normalmente se obtiene un título de 10^6 - 10^7 TCID₅₀/mL de sobrenadante.

c) Condiciones de cultivo (se tendrá en cuenta el entorno potencialmente expuesto, la presencia de especies susceptibles, supervivencia del OMG y efectos sobre el entorno físico).

Los cultivos se desarrollan en el correspondiente laboratorio de seguridad de nivel 3 de acuerdo a los protocolos establecidos (ver apartado 5). La causa más probable es por derramamiento de un cultivo que contenga el OMG. Si éste se produce en el interior de la cabina se deben seguir las recomendaciones previstas en el protocolo de trabajo en cabina. Si se produjera fuera de la cabina se deben de seguir las recomendaciones de seguridad del protocolo de trabajo del P3.

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

Laboratorio de contención con nivel de Seguridad biológica de clase 3: laboratorio preparado para trabajar con agentes biológicos en un nivel 3 de contención física. El laboratorio objeto de autorización se dedica al tratamiento de muestras clínicas y a la investigación en virología en general, actividades que requieren ciertas limitaciones de trabajo.

Según establece el RD 664/1997 para este tipo de laboratorios, cumple con las condiciones siguientes: filtración del aire extraído del espacio de trabajo con filtros HEPA, acceso restringido al personal autorizado, procedimientos de desinfección específicos, control eficiente de vectores, superficies impermeables al agua y de fácil limpieza y resistente a ácidos, alcalinos y disolventes y desinfectantes, almacén de seguridad para agentes biológicos, cabinas de seguridad biológica. También dispone de una autoclave propia para poder esterilizar todo el material que sale de la sala.

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 laboratorio de contención 62.309.02 se encuentra en el tercer piso del Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona. Este edificio, ubicado en el barrio de la Barceloneta, está en el Paseo Marítimo, delante del mar. A su izquierda se encuentra el Hospital del



Mar. Hay diversos colegios en la zona, así como equipamientos municipales (mercados, gimnasios...).

El clima en Barcelona es Mediterráneo, del tipo bajo central. La precipitación mediana anual está alrededor de los 600mm, siendo los valores más elevados cerca de la cordillera del litoral. La estación lluviosa al año, es el otoño, seguida de la primavera, y la seca el verano sobre todo en julio. Con respecto a las temperaturas, los inviernos son suaves, con medias de 9°C a 11°C, las temperaturas son más bajas en las zonas próximas a Besós y a la Zona Franca dónde las mínimas son más frías y los veranos calurosos, entre los 23°C y 24°C por término medio, comportando una amplitud térmica anual moderada. Casi nunca hiela en el centro de Barcelona. La humedad relativa de la ciudad suele estar entre el 60 al 75%.

b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.

La causa más probable es por derramamiento de un cultivo que contenga el OMG. Si éste se produce en el interior de la cabina se deben seguir las recomendaciones previstas en el protocolo de trabajo en cabina. Si se produjera fuera de la cabina se deben de seguir las recomendaciones de seguridad del protocolo de trabajo de la P3.

En otro tipo de accidentes que se puedan producir, como por ejemplo un incendio en el interior de la sala de cultivos, el OMG no tendría ningún efecto en la salud humana o el medio ambiente ya que no se liberaría al exterior sino que quedaría destruido.

No se contempla la posibilidad de salida de material contaminado ni la posibilidad de lesión con objeto punzante

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

Sala de cultivos con presión negativa. Doble puerta para acceder a la sala. Sistema de radiación ultra violeta general. Cabinas de flujo laminar. Batas de laboratorio específicas para la sala de cultivos de tipo III. Guantes individuales y de un solo uso.

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

El personal que trabaja en la zona de utilización confinada de organismos genéticamente modificados dispone de una norma de prevención (NP-05.2: Manual del laboratorio de Contención 62.309.02 con nivel de seguridad biológica de clase 3), que contiene un capítulo específico sobre medidas de emergencia donde se detallan; protocolo de actuación en caso de vertido de agentes biológicos, protocolo de actuación en caso de contacto accidental y protocolo de gestión interna y de notificación de accidentes e incidentes, así como una instrucción básica de actuación.

Anexo III: Manual de Bioseguridad.

Anexo VI: instrucción básica para actuar en emergencias en el laboratorio de contención 62.309.02.