



**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: **FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE LA SIDA-CAIXA**

Nombre: **IrsiCaixa**

Dirección postal: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet, s/n,
08916 Badalona (España)

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Bonaventura Clotet Sala

NIF: 46.106.081 M

Cargo: Director

Tel: 93 465 63 74

Fax: 93 465 39 68

Correo electrónico: bclotet@irsicaixa.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Miguel Angel Martínez de la Sierra

NIF: 02507914-V

Cargo: Investigador senior

Tel: 93 465 63 74. Ext. 106

Fax: 93 465 93 68

Correo electrónico: mmartinez@irsicaixa.es

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

Nombre y apellidos: Julià Blanco Arbues

NIF: 37326144L

Cargo: Investigador senior y Responsable de Prevención de Riesgos Laborales

Tel: 93 465 63 74. ext. 115

Fax: 93 465 93 68

Correo electrónico: jblanco@irsicaixa.es



e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto. Julià Blanco

- 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 X NO

El proyecto con el que se financiará esta investigación es el SAF2016-75277-R, cuyo investigador principal es el Dr. Miguel Angel Martínez de la Sierra, y que lleva por título: Recodificación de genomas virales mediante mutaciones sinónimas como una herramienta para alterar la eficacia biológica de los virus.

- 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:

Octubre de 2016.

b) Número de referencia del expediente:

En trámite.

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Finalidad de la actividad:

Construcción y caracterización de virus de la inmunodeficiencia humana con cambios sinónimos en su uso de pares de codones

Como resultado de la redundancia del código genético, los pares de aminoácidos adyacentes pueden ser codificados por 36 pares de codones sinónimos diferentes. El sesgo en el uso de pares de codones es específico de especie, es decir, algunos pares de codones sinónimos son más o menos frecuentes de lo que cabría esperar de una distribución al azar. La introducción en el genoma viral de pares de codones sinónimos poco frecuentes produce una disminución de la capacidad replicativa de poliovirus, virus de la influenza y el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). Sin embargo, el mecanismo de atenuación no se sabe con certeza. Del mismo modo, no está claro si los virus recodificados son estables in vivo. Nosotros proponemos aquí investigar en qué medida el sesgo en el uso de pares de codones afecta a la capacidad replicativa del VIH-1 así como el efecto que produce en su capacidad evolutiva y patogénesis. En particular, vamos a explorar el posible efecto del uso de pares de codones en la traducción de los mensajeros del VIH-1. Además, también estudiaremos la estabilidad de los virus recodificados y su utilidad como una herramienta para identificar elementos redundantes de ARN funcionales presentes en el genoma del VIH-1. Debido a que este método va dirigido a una función elemental como es la traducción, nuestra hipótesis es que el sesgo en el uso de pares de codones puede tener una aplicación general y servir para alterar el fenotipo de otros virus u otros organismos.



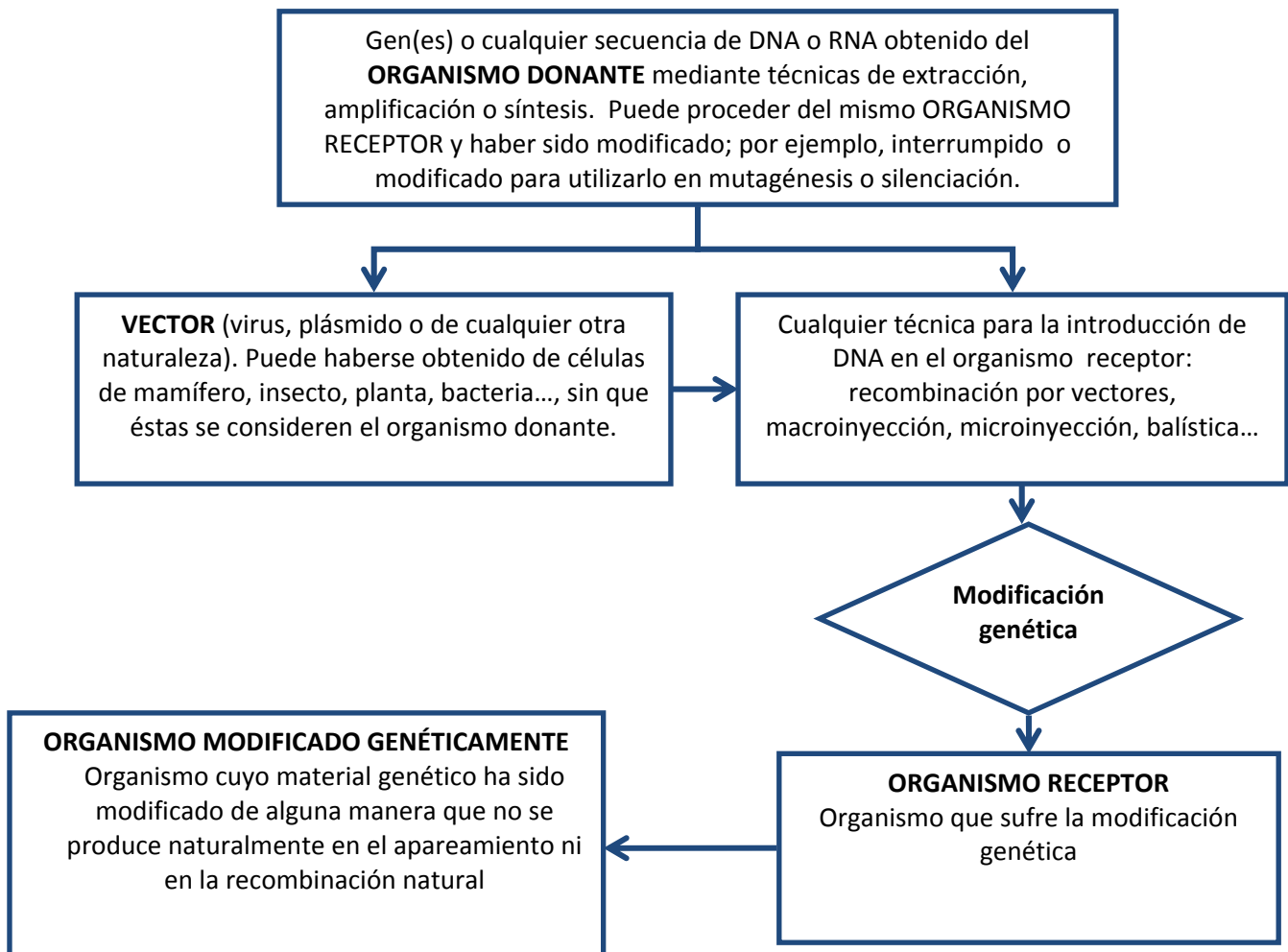
2) Clasificación de la actividad

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 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 2 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 3 | X |
| Tipo 4 | <input type="checkbox"/> |

En este proyecto se trabajará con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en un laboratorio de seguridad biológica LSB-3.

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: Células MT-4

Familia: Retroviridae.

Género: Lentivirus.

Especie: Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1).

Nombre común: Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1).

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

- a) Técnicas de aislamiento:

El virus receptor infeccioso se obtendrá mediante la transfección en células MT-4 de fragmentos de DNA sintéticos solapantes que contengan toda la secuencia genómica del DNA proviral del VIH-1 NL4-3 (GenBank: AF324493.2) (ver secuencia más abajo) [Fujita et al 2013. *Virology* 436, 100-111]. Los fragmentos del genoma viral sintéticos se generarán mediante la recombinación por PCR de oligonucleótidos sintéticos (*Integrated DNA Technologies*) como previamente hemos descrito [Martrus et al 2013. *Retrovirology* 10, 78]. Los productos de PCR resultantes se purificarán (*QIAquick PCR Purification Kit*, QIAGEN) y se secuenciarán para confirmar la presencia de la secuencia deseada (*Big Dye v3.1 kit* y el sistema 3100 de secuenciación de DNA, Applied Biosystems). De esta manera se evitará la utilización de plásmidos bacterianos que contengan clones infecciosos del VIH-1 y las metodologías clásicas de la biología molecular que implican la utilización de enzimas de restricción o de ligación. A continuación, 500 ng de PCRs purificados se electroporarán en células MT-4 como previamente hemos descrito [Martrus et al 2013. *Retrovirology* 10, 78]. Los sobrenadantes de los cultivos celulares transfectados se recogerán a los 3, 5 y 7 días postransfección (células MT-4).

La línea celular MT-4 con la que trabajaremos se ha obtenido del NIH AIDS Reagent Program USA (<https://www.aidsreagent.org>). Estas células han sido y son muy utilizadas para el crecimiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), son negativas para la transcriptasa en reverso y para el antígeno p24 del VIH. Estas células son linfocitos T que provienen de una paciente con leucemia (Harada et al. *Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. Science* 1985, 229:563-566).

- b) Técnicas de identificación:

La presencia de virus en los sobrenadantes de los cultivos se determinará mediante la cuantificación del antígeno viral p24 (*Genscreen HIV-1 Ag assay*, Bio-Rad). Si no se detecta antígeno p24 después de 7 días de cultivo, se realizarán 3 pases en ciego de los cultivos y si no se detecta p24 después de estos pases se considerará que la construcción transfectada no origina un virus viable. El título de infectividad viral de los sobrenadantes de los cultivos positivos para el antígeno p24 (*tissue culture dose for 50% infectivity*, TCID50) se realizará en células MT-4 tal como hemos descrito previamente [Martrus et al 2013. *Retrovirology* 10, 78].

- c) Marcadores genéticos:

Los variantes sintéticos que se generarán tendrán como referencia la secuencia de nucleótidos del virus de referencia NL4-3 (GenBank: AF324493.2) (ver secuencia a continuación).

Virus de referencia NL4-3 (GenBank: AF324493.2).



Longitud 9719 nucleótidos.

Secuencia:

TGGAAGGGCTAATTTGGTCCAAAAAAGACAAGAGATCCTTGATCTGTGGATCTACCACA
CACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGATCAGATATCCAC
TGACCTTTGGATGGTGCTTCAAGTTAGTACCAGTTGAACCAGAGCAAGTAGAAGAGGCCA
ATGAAGGAGAGAACAACAGCTTGTACACCCTATGAGCCAGCATGGGATGGAGGACCCGG
AGGGAGAAGTATTAGTGTGGAAGTTTGACAGCCTCCTAGCATTTCGTACATGGCCCGAG
AGCTGCATCCGGAGTACTACAAAGACTGCTGACATCGAGCTTCTACAAGGGACTTTCCG
CTGGGGACTTTCCAGGGAGGTGTGGCCTGGGCGGGACTGGGGAGTGGCGAGCCCTCAGAT
GCTACATATAAGCAGCTGCTTTTGCCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGA
GCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCT
TGAGTGTCAAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTC
AGACCCTTTTAGTCAGTGTGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACTTGAAAG
CGAAAGTAAAGCCAGAGGAGATCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGG
CAAGAGGCGAGGGGCGGGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGA
AGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCGGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATAAATGGGAA
AAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAACAATATAAACTAAAAACATATAGTATGGGCA
AGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTTTTAGAGACATCAGAAGGCTGT
AGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCA
TTATATAATACAATAGCAGTCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGATGTAAAAGACACC
AAGGAAGCCTTAGATAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAGGCACAGCAA
GCAGCAGCTGACACAGGAAACAACAGCCAGGTCAGCCAAAATTACCTTATAGTGCAGAAC
CTCCAGGGGCAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAA
GTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCAGAAGTAATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAGAA
GGAGCCACCCACAAGATTTAAATACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCC
ATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGATTGCATCCA
GTGCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCA
GGAECTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCCA
GTAGGAGAAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAATAAAAAATAGTAAGAATGTAT
AGCCCTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAACCCTTTAGAGACTATGTA
GACCGATTCTATAAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAAGAGGTAAAAAATTGGATG
ACAGAAAACCTTGTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAAGCATTG
GGACCAGGAGCGACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTGGGGGGACCCGGC
CATAAAGCAAGAGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACCATAATG
ATACAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAAGACTGTTAAGTGTTCATTTGTGGCAA
GAAGGGCACATAGCCAAAAATGTCAGGGCCCTTAGGAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGA
AAGGAAGGACACCAAATGAAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAAGATC
TGGCCTTCCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCC
CCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAG
CCGATAGACAAGGAAGTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAGCGACCCC
TCGTACAATAAAGATAGGGGGCAATTAAGGAAGCTCTATTAGATACAGGAGCAGATG
ATACAGTATTAGAAGAAATGAATTTGCCAGGAAGATGGAACCAAAAATGATAGGGGGAA
TTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATA
AAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGT
TGACTCAGATTGGCTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTGTACCAGTAA
AATTAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAA
TAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTG
GGCCTGAAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAAT
GGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTC
AATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATG
TGGGCGATGCATATTTTTCAGTTCCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTA
CCATACCTAGTATAAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCAC



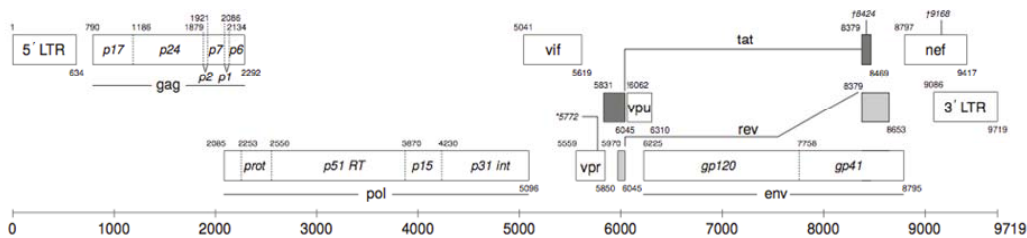
AGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTT
TTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGAT
CTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGA
GGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGGATGG
GTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCATATAGTGCTGCCAGAAAAGGACA
GCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTT
ATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCACTAACAG
AAGTAGTACCCTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGGGAGATTTCTAA
AAGAACCAGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGA
AGCAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAA
CAGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGGCCACACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGG
CAGTACAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAAT
TACCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGA
TTCCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGA
AAGAACCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGGGCAGCCAATAGGGAAAATA
AATTAGGAAAAGCAGGATATGTAAGTACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCTAACGG
ACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGAT
TAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATTTGGGAATCATCAAGCACAACCAG
ATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAG
TCTACCTGGCATGGGTACCAGCACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAAT
TGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAG
AACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACCTACCACCTG
TAGTAGCAAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGC
ATGGACAAGTAGACTGTAGCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAA
AAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCAG
CAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCCTCTTAAATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAA
AAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTGTT
GGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAA
TAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAAC
ATCTTAAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGA
TTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTA
AAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCA
GAGATCCAGTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAA
TACAAGATAATAGTGACATAAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATT
ATGAAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAACACA
TGGAAAAGATTAGTAAAACACCATATGTATATTTCAAGGAAAGCTAAGGACTGGTTTTAT
AGACATCACTATGAAAGTACTAATCCAAAAATAAGTTTCAGAAGTACACATCCCCTAGGG
GATGCTAAATTAGTAATAACAACATATTGGGGTCTGCATACAGGAGAAAGAGACTGGCAT
TTGGGTACAGGAGTCTCCATAGAATGGAGGAAAAAGAGATATAGCACACAAGTAGACCT
GACCTAGCAGACCAACTAATTCATCTGCACTATTTGATTGTTTTTCAGAATCTGCTATA
AGAAATACCATATTAGGACGTATAGTTAGTCCTAGGTGTGAATATCAAGCAGGACATAAC
AAGGTAGGATCTCTACAGTACTTGGCACTAGCAGCATTAATAAAAACCAAACAGATAAAG
CCACCTTTGCCTAGTGTTAGGAACTGACAGAGGACAGATGGAACAAGCCCCAGAAAGACC
AAGGGCCACAGAGGGAGCCATACAATGAATGGACACTAGAGCTTTTAGAGGAACTTAAGA
GTGAAGCTGTTAGACATTTTCTAGGATATGGCTCCATAACTTAGGACAACATATCTATG
AACTTACGGGGATACTTGGGCAGGAGTGGAAAGCCATAATAAGAATTCTGCAACAACCTGC
TGTTTTATCCATTTTCAAGATTGGGTGTGCACATAGCAGAATAGGCGTTACTCGACAGAGGA
GAGCAAGAAATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAG
CCTAAAACCTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCATTGCCAAGTTTGT
TTCATGACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGA
GCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTAGTACATGTA
ATGCAACCTATAATAGTAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAATAGCAATAGTTT



GTGTGGTCCATAGTAATCATAGAATATAGGAAAATATTAAGACAAAAGAAAATAGACAGG
TTAATTGATAGACTAATAGAAAAGAGCAGAAGACAGTGGCAATGAGAGTGAAGGAGAAGTA
TCAGCACTTGTGGAGATGGGGGTGGAAATGGGGCACCATGCTCCTTGGGATATTGATGAT
CTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAAGGA
AGCAACCACCCTCTATTTTGTGCATCAGATGCTAAAGCATATGATACAGAGGTACATAA
TGTTTGGGCCACACATGCCTGTGTACCCACAGACCCCAACCCACAAGAAGTAGTATTGGT
AAATGTGACAGAAAATTTTAACATGTGGAAAAATGACATGGTAGAACAGATGCATGAGGA
TATAATCAGTTTATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTGTAAAATTAACCCCACTCTGTGT
TAGTTTAAAGTGCAGTGAATTTGAAGAATGATACTAATAACCAATAGTAGTAGCGGGAGAAT
GATAATGGAGAAAGGAGAGATAAAAACTGCTCTTTCAATATCAGCACAAGCATAAGAGA
TAAGGTGCAGAAAGAATATGCATTCTTTTATAAACTTGATATAGTACCAATAGATAATAC
CAGCTATAGGTTGATAAGTTGTAACACCTCAGTCATTACACAGGCCTGTCCAAAGGTATC
CTTTGAGCCAATTCCCATACATTTATTGTGCCCGGCTGGTTTTGCGATTCTAAAATGTAA
TAATAAGACGTTCAATGGAACAGGACCATGTACAAATGTCAGCACAGTACAATGTACACA
TGGAATCAGGCCAGTAGTATCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAGA
TGTAGTAATTAGATCTGCCAATTTACAGACAATGCTAAAACCATAATAGTACAGCTGAA
CACATCTGTAGAAATTAATTGTACAAGACCCAAACAATAACAAGAAAAAGTATCCGTAT
CCAGAGGGGACCAGGGAGAGCATTTGTTACAATAGGAAAAATAGGAAATATGAGACAAGC
ACATTGTAACATTTAGTAGAGCAAATGGAATGCCACTTTAAAACAGATAGCTAGCAAAT
AAGAGAACAATTTGGAAATAATAAAACAATAATCTTTAAGCAATCCTCAGGAGGGGACC
AGAAATTTGTAACGCACAGTTTAAATTTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGTAATTC AACACA
ACTGTTTTAATAGTACTTGGTTTTAATAGTACTTGGAGTACTGAAGGTCAAATAACACTGA
AGGAAGTGACACAATCACACTCCCATGCAGAATAAAACAATTTATAAACATGTGGCAGGA
AGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCTCCCATCAGTGGACAAATTAGATGTTTCATCAAATAT
TACTGGGCTGCTATTAACAAGAGATGGTGGTAATAACAACAATGGGTCCGAGATCTTCAG
ACCTGGAGGAGGCGATATGAGGGACAATTTGGAGAAGTGAATTTATAAATATAAAGTAGT
AAAAATTGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGA
AAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCAC
TATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTTATGTCTGATATAGT
GCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCAC
AGTCTGGGGCATCAAACAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGA
TCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTTGCACCCTGCTGTGCC
TTGGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATAACATGACCTGGAT
GGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATC
GCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTTATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTT
GTGGAATTTGTTTAAACATAACAAATTTGGCTGTGGTATATAAAAATTTATTCATAATGATAGT
AGGAGGCTTGGTAGGTTTAAAGAATAGTTTTTGTCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAG
GCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAG
GCCCCAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGT
GAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCCTTTCAGCTACCA
CCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGCAGGGG
GTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATCTCCTACAGTATTGGAGTCAGGAACTAAAGAA
TAGTGCTGTTAACTTGCTCAATGCCACAGCCATAGCAGTAGCTGAGGGGACAGATAGGGT
TATAGAAGTATTACAAGCAGCTTATAGAGCTATTCGCCACATACCTAGAAGAATAAGACA
GGGCTTGAAAGGATTTTGTATAAGATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAGTGTGATTG
GATGGCCTGCTGTAAGGGAAAAGATGAGACGAGCTGAGCCAGCAGCAGATGGGGTGGGAG
CAGTATCTCGAGACCTAGAAAAACATGGAGCAATCACAAGTAGCAATACAGCAGCTAACA
ATGCTGCTTGTGCCTGGCTAGAAGCACAAGAGGAGGAAGAGGTGGGTTTTCCAGTCACAC
CTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAA
AAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATC
TGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAG
GGTCCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATA

AGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATG
 GAATGGATGACCCTGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTTC
 ATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAAGTGTGACATCGAGCTTGCT
 ACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACTGGGGAGT
 GGCGAGCCCTCAGATGCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCTGTACTGGGTCTCTCTGG
 TTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCT
 CAATAAAGCTTGCCTTGAGTGTCTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT
 AACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA

Mapa genético del VIH-1 NL4-3



d) Marcadores fenotípicos:

La secuencia del VIH-1 NL4-3 codifica por todas las proteínas virales y genera un virus capaz de infectar células humanas portadoras del receptor CD4 y el correceptor CXCR4.

e) Estabilidad genética:

El VIH-1 NL4-3 está muy adaptado a crecer en la línea celular que se utilizará, MT-4, y por lo tanto su propagación en estas células no alterará su composición genética

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores:

La secuencia del VIH-1 NL4-3 es una quimera entre la secuencia del DNA proviral obtenida del paciente NY5 (5'LTR, gag, pol, vif y vpr parcial) (5751 nucleótidos) y del paciente LAV (vpr parcial, tat, rev, vpu, env, nef y 3'LTR) (3968 nucleótidos) (descrito en Adachi et al. Production of AIDS-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectipous molecular clone. Journal of Virology 1986, 59, 284-291).

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI X 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:

Únicamente los seres humanos vivos son susceptibles al VIH.

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 biológico asignado: 3 (Real Decreto 664/1997 de 12 de mayo, BOE nº 124 del 24 de mayo)

a) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?

El VIH-1 es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El VIH es un microorganismo que ataca al sistema Inmune de las personas, debilitándolo y haciéndolos vulnerables ante una serie de infecciones, algunas de las cuáles pueden poner en peligro la vida. El SIDA es el estado de la infección por el VIH caracterizado por bajos niveles de defensas y la aparición de infecciones oportunistas. El VIH se transmite a través de los siguientes fluidos corporales: sangre, semen, secreciones vaginales y leche materna. En la actualidad existen medicamentos, denominados antirretrovirales, que inhiben enzimas virales esenciales como la transcriptasa en reverso, la proteasa y la integrasa u otras proteínas virales bloqueando de esta manera la replicación del VIH. La utilización de antirretrovirales detiene la progresión de la enfermedad y el SIDA aunque no son capaces de eliminar el virus, siendo por tanto necesario su administración durante toda la vida del paciente infectado.

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

SI NO

Porqué:

No aplica. VIH-1 NL4-3 es una cepa virulenta.

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

Si.

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

El VIH-1r se manipulara en nuestro laboratorio de bioseguridad LSB-3, donde todo el personal ha recibido la formación necesaria y ha adquirido amplia experiencia para desarrollar las actividades que se llevan a cabo en esta instalación, cumpliendo con las directrices del real decreto RD664/1997 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos derivados de la exposición a agentes biológicos.

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?:

El VIH no es capaz de propagarse fuera de un cultivo o de un individuo infectado, el VIH, al igual que el resto de los virus, es un parásito obligatorio no puede autoreplicarse en ausencia de una célula susceptible. De igual manera las células que se utilizarán, MT-4, para propagar el virus no pueden sobrevivir fuera del cultivo ya que requieren un medio específico (RPMI 1640, 80%; suero fetal bovino, 20%; DMSO, 10%), una temperatura constante de 37 grados centígrados y una atmósfera que contenga un 5% de CO₂, condiciones que solo se alcanzan en una incubadora específica.



En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

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

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

No aplica.

d) Posibles nichos ecológicos:

No aplica.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplica.

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

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

Ninguna.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

El VIH solo puede infectar a seres humanos vivos y por las vías de transmisión descritas arriba.

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

Individuos infectados con el VIH. Los individuos infectados (37 millones) están distribuidos por todo, siendo el África subsahariana la zona de mayor prevalencia. En España cada día se infectan 10 personas y desde el comienzo de la pandemia originada por el VIH en España se han declarado 84679 casos de SIDA.

12) Hábitat natural del organismo:

Células humanas portadoras del receptor CD4 y del correceptor CCR5 o CXCR4.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1).



Taxonomía:

Familia: Retroviridae.

Género: Lentivirus.

Especie: Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1).

Nombre común: Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1).

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

La recodificación del genoma viral se realizará mediante la síntesis química de los fragmentos recodificados [Cello et al 2002. Science 297, 1016-1018]. Estos fragmentos recodificados se transfectarán en células susceptibles (e.g. células MT-4) junto con los fragmentos genómicos virales que falten para completar el genoma completo del VIH-1 [Fujita et al 2013. Virology 436, 100-111]. Estos últimos fragmentos, recodificados o portadores de la secuencia salvaje del virus, también procederán de una síntesis química, evitándose la utilización de plásmidos bacterianos que contengan clones infecciosos del VIH-1 y las metodologías clásicas de la biología molecular que implican la utilización de enzimas de restricción o de ligación. Los variantes sintéticos que se generarán tendrán como referencia la secuencia de nucleótidos del virus de referencia NL4-3 (GenBank: AF324493.2) (ver secuencia más arriba). Los fragmentos del genoma viral sintéticos se generarán mediante la recombinación por PCR de oligonucleótidos sintéticos (*Integrated DNA Technologies*) como previamente hemos descrito [Martrus et al 2013. Retrovirology 10, 78]. Los productos de PCR resultantes se purificarán (*QIAquick PCR Purification Kit*, QIAGEN) y se secuenciarán para confirmar la presencia de la secuencia deseada (*Big Dye v3.1 kit* y el sistema 3100 de secuenciación de DNA, Applied Biosystems).

3) Método de obtención:

- a) Extracción
- b) PCR X
- c) Síntesis *in vitro* X (síntesis química)

4) Función del gen/genes en el organismo donante

Dirigir la síntesis del VIH-1 completo con capacidad replicativa e infecciosa.

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

SI X NO

a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

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

b) ¿De que modo se manifiesta la patogenicidad?



El VIH-1 es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El VIH es un microorganismo que ataca al sistema Inmune de las personas, debilitándolo y haciéndoles vulnerables ante una serie de infecciones, algunas de las cuáles pueden poner en peligro la vida. El SIDA es el estado de la infección por el VIH caracterizado por bajos niveles de defensas y la aparición de infecciones oportunistas. El VIH se transmite a través de los siguientes fluidos corporales: sangre, semen, secreciones vaginales y leche materna. En la actualidad existen medicamentos, denominados antirretrovirales, que inhiben enzimas virales esenciales como la transcriptasa en reverso, la proteasa y la integrasa u otras proteínas virales bloqueando de esta manera la replicación del VIH. La utilización de antirretrovirales detiene la progresión de la enfermedad y el SIDA aunque no son capaces de eliminar el virus, siendo por tanto necesario su administración durante toda la vida del paciente infectado.

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

Si, ya que la secuencia del VIH codifica por todas las proteínas virales y genera un virus capaz de infectar células humanas portadoras del receptor CD4 y el correceptor CXCR4

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

Si, el VIH tiene una alta tasa de recombinación y en el caso de que se produzca una doble infección entre el virus receptor de tipo salvaje y los mutantes donantes se producirán virus recombinantes entre ambos.

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

- 1) Tipo de modificación genética:

- | | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| a) Inserción de material genético | X |
| b) Deleción de material genético | <input type="checkbox"/> |
| c) Sustitución de bases | <input type="checkbox"/> |
| d) Fusión celular | <input type="checkbox"/> |
| e) Otros, especifíquese | |

- 2) Finalidad de la modificación genética:

Obtención de partículas infecciosas del VIH

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

Como se ha mencionado en el apartado anterior, se generarán virus infecciosos mediante la transfección en células MT-4 de fragmentos de PCR solapantes que contengan toda la secuencia genómica del DNA proviral del VIH. Brevemente, 500 ng de PCRs purificados se electroporarán en células MT-4 como previamente hemos descrito [Martrus et al 2013. Retrovirology 10, 78]. Los sobrenadantes de los cultivos celulares transfectados se recogerán a los 3, 5 y 7 días postransfección (células MT-4). La presencia de virus en los sobrenadantes de los cultivos se determinará mediante la cuantificación del antígeno viral p24 (*Genscreen HIV-1 Ag assay*, Bio-Rad). Si no se detecta antígeno



p24 después de 7 días de cultivo, se realizarán 3 pases en ciego de los cultivos y si no se detecta p24 después de estos pases se considerará que la construcción transfectada no origina un virus viable. El título de infectividad viral de los sobrenadantes de los cultivos positivos para el antígeno p24 (*tissue culture dose for 50% infectivity*, TCID₅₀) se realizará en células MT-4 tal como hemos descrito previamente [Martrus et al 2013. *Retrovirology* 10, 78].

Los fragmentos de DNA que codifican por el VIH, ya sean mutantes (donante) o portadores de la secuencia salvaje del virus (receptor), procederán de una síntesis química, evitándose la utilización de plásmidos bacterianos que contengan clones infecciosos del VIH-1 y las metodologías clásicas de la biología molecular que implican la utilización de enzimas de restricción o de ligación.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

a. Tipo e identidad del vector:

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):

d. Gama de hospedadores del vector:

e. Características de la movilidad del vector:

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:

Decodificaremos el genoma completo del VIH-1, es decir, las regiones codificantes *gag*, *pol* y *env*. Se recodificará sinónimamente el uso de codones o pares de codones y/o las frecuencias de los dinucleótidos CpG y UpA. En función del tamaño del fragmento genómico recodificado, se generarán variantes que contengan decenas, cientos o miles de sustituciones sinónimas. La generación de virus mutantes se realizará sobre la secuencia del genoma del virus de referencia NL4-3 (GenBank: AF324493.2) (ver secuencia en el apartado del organismo receptor).

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



El genoma del VIH-1 está compuesto por los tres genes básicos de la familia de los retrovirus. Se trata de los genes gag, pol y env. El gen estructural gag codifica por las proteínas: p17, p24, p2, p7, p1 y p6. El gen estructural env codifica por las glicoproteínas de la envuelta del virus: gp120 y gp41. El gen pol codifica las tres enzimas virales: proteasa, transcriptasa en reverso e integrasa. Cada uno de estos genes codifica proteínas que ayudan a la reproducción del virus. El genoma del VIH posee otros seis genes adicionales: tat, vpr, rev, vpu, vif y nef.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Como se ha mencionado arriba, se generarán virus infecciosos mediante la transfección en células MT-4 de fragmentos de PCR solapantes que contengan toda la secuencia genómica del DNA proviral del VIH. Brevemente, 500 ng de PCRs purificados se electroporarán en células MT-4 como previamente hemos descrito [Martrus et al 2013. Retrovirology 10, 78].

Como también se ha mencionado arriba, los fragmentos de DNA que codifican por el VIH procederán de una síntesis química, evitándose la utilización de plásmidos bacterianos que contengan clones infecciosos del VIH-1 y las metodologías clásicas de la biología molecular que implican la utilización de enzimas de restricción o de ligación.

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

Contiene todos los genes estructurales del VIH.

e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:

Contiene todos los genes y elementos reguladores del VIH.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Si, conocemos la secuencia de todos los virus mutantes que generaremos.

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

No.

h) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.

No.

VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre?

No.



En caso afirmativo:

- i) Número de copias:
- ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?

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 X

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) X

Aportar toda la documentación al respecto.

La presencia de virus en los sobrenadantes de los cultivos se determinará mediante la cuantificación del antígeno viral p24 (*Genscreen HIV-1 Ag assay*, Bio-Rad). El título de infectividad viral de los sobrenadantes de los cultivos positivos para el antígeno p24 (*tissue culture dose for 50% infectivity*, TCID50) se realizará en células MT-4 tal como hemos descrito previamente [Martus et al 2013. *Retrovirology* 10, 78] (Se adjunta copia de este trabajo).

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:

Si, esperamos que numerosos mutantes diseñados tengan un capacidad replicativa inferior a la del virus de tipo salvaje, es decir, sean virus atenuados.



- 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.

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

No.

- f) Marcadores específicos del OMG:

Las partículas virales del VIH acumuladas en el sobrenadante del cultivo de células MT-4 transfectadas contienen un elevado número de proteínas estructurales p24.

- 3) Estabilidad genética del OMG (Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones)

En este proyecto determinaremos si la alteración genética introducida en los virus mutantes es estable ya que es uno de los objetivos de nuestro proyecto (ver más abajo: Establecer la estabilidad genotípica y fenotípica de los virus recodificados sinónimamente). El estudio de la estabilidad de los virus recodificados se llevará a cabo en células MT-4. Se realizarán pases seriados de virus siguiendo la metodología que hemos descrito previamente [13] (Nevot et al 2016, enviado a publicar; Nevot et al *Abstract number 3200, 2016 Keystone Symposia Conference on Positive-Strand RNA Viruses*). Brevemente, los virus se añadirán a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.0002 a 1×10^6 células MT-4. A los 4 días una décima parte del cultivo, incluyendo sobrenadante y células, se transferirán a 1×10^6 células MT-4 frescas. La producción viral se monitorizará mediante la cuantificación del antígeno viral p24. La capacidad replicativa de los virus en los sucesivos pases se determinará mediante el modelo de ajuste lineal. La evolución genética de los virus en los sucesivos pases en cultivo se llevará a cabo mediante secuenciación masiva. Con objeto de asignar un genotipo a un fenotipo determinado, haremos uso de la genética reversa de algunos de los variantes (mutaciones puntuales o conjunto de mutaciones) seleccionados tras la propagación y evolución de los virus recodificados. La generación de virus infeccioso en estos experimentos de genética en reverso se llevará a cabo como se describe en otros apartados; igualmente, la cinética de crecimiento de estos nuevos variantes generados se determinará como se ha descrito anteriormente.

- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos:

No existe posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos ya que todo el trabajo se realizará en un laboratorio de bioseguridad LSB-3.

- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados.

- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG.



La presencia de virus en los sobrenadantes de los cultivos se determinará mediante la cuantificación del antígeno viral p24 (*Genscreen HIV-1 Ag assay*, Bio-Rad). El título de infectividad viral de los sobrenadantes de los cultivos positivos para el antígeno p24 (*tissue culture dose for 50% infectivity*, TCID50) se realizará en células MT-4 tal como hemos descrito previamente [Martrus et al 2013. *Retrovirology* 10, 78] (Se adjunta copia de este trabajo).

b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente.

No aplica.

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

1) Naturaleza de las operaciones:

- a) Enseñanza
- b) Investigación
- c) Desarrollo

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

a) Volumen máximo en el caso de microorganismos:

15 ml de sobrenadante de cultivo procedente de células MT-4 transfectadas con el genoma del VIH (NL4-3).

b) Número de plantas:

c) Número de animales:

3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada

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

La actividad durará 3 años, desde el uno enero de 2017 hasta el treinta y uno de diciembre de 2019.

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

- A. Recodificar sinónimamente el genoma del VIH-1 para modificar su capacidad replicativa.
- B. Establecer la estabilidad genotípica y fenotípica de los virus recodificados sinónimamente.
- C. Determinar si la alteración del fenotipo viral se debe a un cambio en el uso de codones o pares de codones y/o a la alteración de la frecuencia de los dinucleótidos CpG y UpA.
- D. Dilucidar el mecanismo implicado en la atenuación viral, es decir, determinar si los cambios de nucleótido sinónimos afectan a la traducción de los mensajeros virales y/o a la interacción del RNA viral con el sistema innato celular.



- 5) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa (señalar nombre y ubicación), y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG:

El OMG se genera en nuestra instalación.

- 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).

No aplica.

- 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):

Todo el procedimiento se llevará a cabo dentro de las instalaciones de bioseguridad LSB-3 de la Fundación IrsiCaixa. La recodificación del genoma viral se realizará mediante la síntesis química de los fragmentos recodificados. Estos fragmentos recodificados se transfectarán en células MT-4 junto con los fragmentos genómicos virales que falten para completar el genoma completo del VIH-1. Estos últimos fragmentos, recodificados o portadores de la secuencia salvaje del virus, también procederán de una síntesis química, evitándose la utilización de plásmidos bacterianos que contengan clones infecciosos del VIH-1 y las metodologías clásicas de la biología molecular que implican la utilización de enzimas de restricción o de ligación. Los variantes sintéticos que se generarán tendrán como referencia la secuencia de nucleótidos del virus de referencia NL4-3. Los fragmentos del genoma viral sintéticos se generarán mediante la recombinación por PCR de oligonucleótidos sintéticos (*Integrated DNA Technologies*) como previamente hemos descrito. Los productos de PCR resultantes se purificarán (*QIAquick PCR Purification Kit*, QIAGEN) y se secuenciarán para confirmar la presencia de la secuencia deseada (*Big Dye v3.1 kit* y el sistema 3100 de secuenciación de DNA, Applied Biosystems). Como se ha mencionado más arriba, se generarán virus infecciosos mediante la transfección en células susceptibles de fragmentos de PCR solapantes que contengan toda la secuencia genómica del DNA proviral del VIH-1. Brevemente, 500 ng de PCRs purificados se electroporarán en células MT-4 como previamente hemos descrito (ver copias de los trabajos que se adjuntan). Los sobrenadantes de los cultivos celulares transfectados se recogerán a los 3, 5 y 7 días posttransfección. La presencia de virus en los sobrenadantes de los cultivos se determinará mediante la cuantificación del antígeno viral p24 (*Genscreen HIV-1 Ag assay*, Bio-Rad). El título de infectividad viral de los sobrenadantes de los cultivos positivos para el antígeno p24 (*tissue culture dose for 50% infectivity*, TCID50) se realizará en células MT-4 tal como hemos descrito previamente.

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

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 LSB-3 está situado en la 2ª planta del edificio maternal del HGTiP (hospital extraurbano. (Ver mapa Fundación IrsiCaixa dentro de la carpeta Planos- Mapas-Fotos) sin lindar con otros departamentos del hospital. En esta área del edificio no hay ingreso de pacientes. Las entradas están señalizadas con el símbolo de riesgo biológico según normativa.

Las conducciones de aire son independientes del resto de laboratorios. El laboratorio dispone de presión negativa con un medidor situado en la entrada del LSB-3. Además, dispone de una antesala con doble puerta cuya apertura nunca es simultánea.

El acceso al LSB-3 y resto de laboratorios es restringido accediendo solo personal autorizado mediante sistema biométrico de huella digital. Se dispone de cámaras de vigilancia y sistema de alarma de entrada/salida siempre activada fuera del horario laboral, fines de semana y festivos.

El laboratorio donde se realiza la actividad dispone de las medidas necesarias para un nivel de contención adecuado.

Detalle

Instalación

- Presión negativa. Medidor en la entrada
- Antesala con doble puerta
- Filtros absolutos Hepa tipo H13
- Techos sin juntas
- Suelo sin juntas, no poroso, antideslizante y superficie de fácil limpieza

Mobiliario

- Específico de laboratorio sin juntas, no poroso, resistente y superficies de fácil limpieza

Equipos de laboratorio de contención

- Cabinas de bioseguridad clase II tipo A con alarma acústica.
- Centrífugas con buckets y tapas de seguridad y alarma de imbalance
- Autoclave con alarma acústica

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

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

Se adjunta los planos (*dentro de la carpeta Planos-Mapas-Fotos*)

- Plano 1_planta situación Lab IrsiCaixa-LRT
- Plano 2_ Laboratorio LSB-3
- Plano 3_Salidas general emergencia –LRT
- Plano 4. Puertas emergencia y extintores LSB-3
- Plano 5. Puertas emergencia y extintores LAB. CENTRAL
- Mapa Fundación IrsiCaixa

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

La temperatura de los laboratorios es de 21°C para el buen funcionamiento de los equipos y el confort del personal.

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:



La actividad de la actividad descrita (Parte A y C) se realizará en el laboratorio de bioseguridad de nivel 3, habilitado para manipular virus infecciosos con el nivel de seguridad requerido, cumpliendo con las directrices del real decreto RD664/1997 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.

| LABORATORIO LSB-3 |
|--|
| El laboratorio se encuentra separado de otras zonas del mismo edificio. |
| El laboratorio es hermético, permitiendo que se fumigue. |
| Mobiliario y equipos |
| Superficies resistentes a agentes de descontaminación y de fácil limpieza. |
| Acceso al laboratorio a través de una esclusa/transfer |
| Presión negativa respecto a la presión del medio ambiente inmediato |
| Aire de entrada y de salida del laboratorio tratado con filtros HEPA absolutos de eficacia H13. |
| Cabinas de seguridad biológica flujo laminar clase II tipo A2 dispuestas al final del LSB-3. |
| Autoclave localizada en la "Sala Autoclave" anexa al LSB-3 con puerta de entrada en el LSB-3 y puerta de salida en la "sala autoclave". |
| Normas de trabajo |
| Acceso restringido. Acceso con sistema biométrico digital de huella, previa autorización de la Institución. |
| Señalización de peligro biológico en la puerta. |
| Señalización de peligro biológico en el equipamiento que aloja material biológico. |
| Medidas específicas para evitar la formación y difusión de aerosoles. |
| Indumentaria de protección |
| Se utilizan batas quirúrgicas desechables, gafas de protección, calzado cerrado, mascarilla quirúrgica, polainas quirúrgicas, pantallas protectoras, delantal criogénico. |
| Lavado de la ropa de trabajo. Las batas blancas para el trabajo en el laboratorio central las proporciona el HUGTiP encargándose además del lavado. La indumentaria de trabajo adicional obligatoria en el LSB-3 es desechable y de un solo uso. |
| Se dispone de espacio específico para la ropa de trabajo (percheros; taquillas). |
| No es necesario el cambio de ropa y calzado antes de entrar y salir de la instalación. |
| El personal no está obligado a ducharse antes de abandonar la zona controlada. |
| Existe un control eficaz de roedores e insectos. Empresa S.A.C. Antiplagas de Cataluña, S.L. |
| Residuos |
| Inactivación de los OMG presentes en el material sólido contaminado mediante el uso de autoclave. |
| Eliminación de los OMG presentes en medios líquidos en los efluentes de los desagües previa inactivación, durante al menos 24 horas, mediante el uso de desinfectante amplio espectro. En el caso de la eliminación de placas de cultivo, a éstas previamente se les añade desinfectante (Safe-Sept) y al día siguiente se autoclavan. |

| |
|---|
| Otras medidas |
| Se dispone de material para la recogida de posibles vertidos (papel absorbente) disponible en la zona de trabajo. |
| Almacenamiento de material fungible y reactivos es en el propio laboratorio |
| Se dispone de ventana de observación y cámara para ver a los ocupantes. |

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

El Instituto IrsiCaixa dispone de un manual para el trabajador que incluye:

- Normativa de higiene, salud y trabajo en el laboratorio de Bioseguridad y resto de laboratorios
- Medidas de seguridad, que incluye adopción de BPL
- Gestión de residuos
- Transporte de sustancias infecciosas
- Plan de emergencia
- Plan de prevención de IrsiCaixa. Derechos y Obligaciones

Dentro de las buenas prácticas de laboratorio se tiene en cuenta:

- Evaluación del riesgo de los agentes biológicos que se manipulan
- Señalización de advertencia y peligro biológico en las puertas y equipos (*Fotos 1-2*)
- Uso obligatorio de indumentaria apropiada para trabajar en un LSB-3 y EPIs (*Fotos 1-2*)
- La manipulación de agentes infecciosos (VIH/VHC) es obligatorio realizarlo en cabina de bioseguridad
- Conocimiento de las salidas de emergencias, extintores y teléfonos de emergencia
- Inventario actualizado de las muestras

2) Formación del personal adscrito:

El personal recibe un curso formativo anual por parte de la empresa de Prevención de Riesgos laborales (Unipresalud), asesorado por la supervisora y el responsable de riesgos adaptándose a la actividad e instalaciones del laboratorio.

Todo personal nuevo, además de disponer de toda la documentación descrita, recibe un curso de formación referente a la seguridad y riesgos que implica el trabajo en el laboratorio LSB-3. Este curso hace referencia a la organización de la instalación, el uso adecuado de los equipos, la capacitación e información del personal autorizado, normas generales de conducta y seguridad, hábitos de trabajo para la actividad confinada en el LSB-3, el nivel de bioseguridad y las medidas de protección requeridas.

3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

- El laboratorio dispone de un protocolo interno de limpieza, mantenimiento y descontaminación. (*LMD-PR-01. Limpieza, mantenimiento y descontaminación, punto 9 dentro del Manual de acogida IrsiCaixa 2016*) donde se detalla las limpiezas mensuales de todos los laboratorios incluyendo el LSB-3.

- Se realiza un mantenimiento anual para la desinsectación del LSB-3 (*Desinsectación anual - Lab Bioseguridad - D1608245 dentro del Manual de acogida IrsiCaixa 2016/ Limpieza, mantenimiento y descontaminación, punto 9*).
- El HGTiP dispone de un contrato para el control de plagas con la empresa S.A.C. Antiplagas de Cataluña, S.L.
- La empresa Imtech se encarga del mantenimiento y eliminación de filtros hepas cuando éstos hay que renovarlos.

4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

La supervisora del laboratorio (responsable de vigilancia y control) es la encargada del buen funcionamiento de los laboratorios incluyendo el LSB-3, del control de equipos y la adecuada gestión de residuos.

Los manuales de uso de los equipos en papel están dispuestos en dos estantes, uno en el laboratorio LSB-3 donde están los manuales de los equipos ubicados en esta sala y otro en el laboratorio central. Además, se dispone en la red interna del instituto una carpeta que puede ser consultada por el trabajador autorizado.

El mantenimiento de equipos lo realizan empresas especializadas en los diferentes equipos. Se adjunta los contratos de mantenimiento establecidos con las diferentes empresas y que son renovados anualmente.

- El autoclave es revisado periódicamente por personal técnico de la empresa Matachana. Tres revisiones anuales. (*Protocolos de uso, contratos, validación y revisiones equipos lab/contratos de mantenimiento/Autoclave y Protocolos de uso, contratos, validación y revisiones equipos lab/ Calibraciones/Autoclave*).
- Las cabinas de seguridad, centrifugas, incubadores y pequeño equipamiento es revisado periódicamente por personal técnico de la empresa TBS. Revisión anual o quincenal dependiendo de los requerimientos de cada equipo. Esta empresa se encarga además de reparar las averías de determinados equipos. (*Protocolos de uso, contratos, validación y revisiones equipos lab/contratos de mantenimiento/ Contrato TBS-EQUIPOS y Protocolos de uso, contratos, validación y revisiones equipos lab/ Calibraciones de equipos/cabinas de bioseguridad/Informe de cualificacio de cabines de seguretat biológica dic.2015 y Protocolos de uso, contratos, validación y revisiones equipos lab/ Calibraciones de equipos/Equipos Lab IrsiCaixa*).
- La infraestructura del LSB-3 (clima, filtros, puertas, extintores, cuadro de mando y protección) es revisado periódicamente por personal técnico de la empresa Imtech. Revisión mensual. (*Protocolos de uso, contratos, validación y revisiones instalaciones/ Contrato Imtech- CT10.0170*).
- La infraestructura del resto de laboratorios (clima, filtros, puertas, extintores) es revisado periódicamente por personal técnico de la empresa Geinstal. Revisión mensual. (*Protocolos de uso, validación y revisiones instalaciones / Contrato Incendios y /Certificado Incendios 2016 y /Certificado revisión extintores -ISMAT-2016 y /Contrato clima - GEINSTAL-LC y /Contrato Imtech- CT10.0170*).

5) Programas de inspección y control del confinamiento:

Los programas de inspección y control de confinamiento lo realiza el personal de mantenimiento del HGTiP en colaboración con la empresa Imtech/Geinstal.



X.- GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1) Encargado de la gestión de residuos:

| | | | | |
|----------------------------------|----|--------------------------|----|--------------------------|
| gestión interna: | SÍ | <input type="checkbox"/> | NO | X |
| gestión por una empresa externa: | SÍ | X | NO | <input type="checkbox"/> |

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

ECOPIIL contratada por el ICS (Instituto Catalán de la Salud). La gestión de residuos generados es realizada por el ICS a través de la empresa ECOPIIL. IrsiCaixa sigue estrictamente las directrices indicadas por el HGTiP y son los encargados de la retirada de los residuos generados.

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

El instituto IrsiCaixa dispone de 2 autoclaves, uno ubicado en el LSB-3 para inactivar el material infeccioso desechado y otro ubicado en el laboratorio central para la esterilización de medios y material vidrio de laboratorio no infeccioso.

Todo el material sólido (pipetas, frascos, tubos, guantes,...) en contacto con material infeccioso está previamente en contacto con un desinfectante de amplio espectro de acción (*Safe Sept. CE 0473/UNE1903*) antes de autoclavarse.

El material infeccioso líquido previamente inactivado se elimina por el desagüe.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Intrusión. El acceso al laboratorio de Bioseguridad y resto de laboratorios es restringido accediendo solo personal autorizado mediante sistema biométrico de huella digital. Existe un control de movimiento mediante cámaras de seguridad y un sistema de alarma de entrada y salida conectado en horarios no laborales, festivos y fin de semana.

Derrame de material biológico infeccioso. En caso de producirse un derrame, la mayor probabilidad es que ocurra dentro de una cabina de bioseguridad pudiendo afectar a los trabajadores del laboratorio de bioseguridad. Más improbable es que ocurra un derrame fuera de la cabina aunque siempre sería dentro del laboratorio de Bioseguridad. Esta incidencia podría ocurrir en caso de caída accidental durante el traslado de placas a un incubador. Ante cualquiera de estos casos existe un procedimiento de actuación incluido en la normativa de la institución al alcance de todos los trabajadores.

Uso inadecuado de equipos de riesgos. Se podría producir un accidente ante el uso impropio de determinados equipos (cabinas de bioseguridad, autoclave, centrífugas, tanques nitrógeno). Al trabajador se le proporciona la normativa de trabajo, seguridad e higiene que incluye el uso adecuado de los equipos. Se dispone del manual de uso de todos los equipos en papel y en pdf. Anualmente se imparte un curso formativo en riesgo laboral adaptado a nuestra actividad, instalaciones y equipos.

Emisión de agentes infecciosos.

Interior del área de contención. La probabilidad de que se produzca emisiones es muy baja dado que todo material infeccioso se manipula dentro de las cabinas de clase II. Podría ocurrir un fallo del funcionamiento de la cabina de seguridad, y en tal caso se activaría una alarma acústica que indica



fallo de funcionamiento. La producción de aerosoles, es un hecho bastante improbable en nuestras actividades, excepto quizás durante el uso de las centrifugas. Para evitar este riesgo se trabaja siempre con buckets con tapas selladas y así evitar accidentes de salpicaduras, emisión de aerosoles o rotura de tubos. No obstante, hay que remarcar que nuestro instituto centra su trabajo en la investigación del VIH/VHC siendo estos patógenos no transmisibles por vía aérea.

Interior del área de contención. Es improbable dado que únicamente se extrae material infeccioso (siempre congelado y en contenedores de seguridad) fuera del laboratorio de bioseguridad para realizar envíos a otros centros donde hay establecidas colaboraciones. Todo material infeccioso del laboratorio de Bioseguridad a eliminar es previamente descontaminado mediante la autoclave.

Accidentes. En nuestro caso haría referencia a la exposición de un agente infeccioso mediante principalmente la entrada por vía percutánea (pinchazos, cortes o contacto con piel no intacta) o por salpicaduras a mucosas. Nuestra actividad actualmente no hace uso de material punzante.

Derrames de productos químicos. Las sustancias químicas utilizadas en el laboratorio de Bioseguridad son soluciones que por su concentración no entrañan peligro para la salud.

Incendio u otro tipo de emergencia que puedan ocasionar daños estructurales en LSB-3. En el laboratorio se estima una carga térmica de fuego baja.

Un incendio puede deberse a un fallo eléctrico de la instalación. La instalación eléctrica tiene sistema de seguridad en caso de fallos eléctricos.

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Intrusión. El acceso la LSB-3 y resto de laboratorios es restringido. Acceso mediante sistema biométrico de huella digital. Existen cámaras de vigilancia y sistema de alarma de entrada/salida siempre activado fuera del horario laboral, festivos y fines de semana.

Derrame de material biológico infeccioso en el LSB-3/Emisión de agentes biológicos. La mayor probabilidad de que ocurra este incidente sería dentro de una cabina de bioseguridad. La instalación y los equipos son los adecuados para la contención y seguridad de los trabajadores y medio ambiente.

DETALLE

Instalación

- Presión negativa. Medidor de presión instalado en la entrada del LSB-3
- Antesala con doble puerta de apertura no simultánea
- Filtros absolutos Hepa tipo H13
- Techos y suelos no porosos y sin juntas

Equipos de laboratorio de contención

- Cabinas de bioseguridad clase II tipo A con alarma acústica.
- Centrifugas con buckets y tapas de seguridad con alarma en imbalance
- Autoclave con alarma acústica

Equipos de protección individual y colectiva

- Guantes. CE Cat. III
- Mascarilla quirúrgica. CE- EN 14683. Cat. II
- Batas quirúrgicas de protección. CE 0086
- Polainas quirúrgicas
- Pantalla protección
- Guantes termoprotectores. EN 407 y EN 388
- Guantes específicos antipinchazo y cortes. Ca. II EN 388 – EN 420



- Delantal termo protector
- Calzado cerrado. CE, norma EN-ISO-20347

Accidentes

Además de la obligatoriedad del uso de una indumentaria adecuada para acceder y trabajar en el LSB-3, se dispone de:

- Lavaojos y una ducha de emergencia
- Lavamanos específico en la antesala en caso de accidente
- Botiquín con material básico para primeros auxilios en la antesala
- Manual de procedimiento para el trabajo, higiene y salud
- Curso formativo de seguridad a todo nuevo trabajador
- Curso formativo anual en materia de prevención de riesgos laborales adaptado a nuestra actividad y tipo de instalación

Incendio u otro tipo de emergencia que puedan ocasionar daños estructurales en LSB-3:

- Detectores de humos conectados con la central de alarma del HGTiP
- puertas de entradas conectadas al sistema la central de alarma del HGTiP
- Extintores de fuego (2 de CO2 y 2 de polvo)
- Puerta de emergencia en caso de evacuación rápida

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

El Instituto IrsiCaixa dispone de un manual para el trabajador que incluye:

- Normativa de higiene, salud y trabajo en el laboratorio de Bioseguridad y resto de laboratorios
- Gestión de residuos
- Medidas de seguridad, que incluye adopción de BPL
- Transporte de sustancias infecciosas
- Plan de emergencia
- Plan de prevención de IrsiCaixa. Derechos y Obligaciones
- Limpieza, descontaminación
- Dossier del training básico de seguridad, trabajo e higiene

4) Planes de emergencia:

Se proporciona protocolos interno de actuación en caso de emergencia en los laboratorios de IrsiCaixa y evacuación del edificio donde se describen los planes de emergencia y la normativa aplicada por el Instituto catalán de salud y del HIGTiP.

DOCUMENTOS

- *Plan de emergencia IrsiCaixa (punto 6. dentro de la carpeta de Manual de acogida IrsiCaixa 2016)*
 - *Plan de emergencia IrsiCaixa*
 - *Consignas Pau HIGTiP*
 - *Normativa interna – ICS*
 - *Prevenió de Riscos laborals a l'ICS*



- *PR-ACCIN-01. IRSICAIXA_Proced_inv_accid.*
- *Medidas de Seguridad para la salud. Control de riesgos físicos. Tipos de accidente.*



PARTE B

DIRECCION GENERAL DE
CALIDAD Y EVALUACION
AMBIENTAL Y MEDIO NATURAL

COMISIÓN NACIONAL DE
BIOSEGURIDAD

NOTIFICACIÓN DE PRIMER USO DE INSTALACIONES PARA REALIZAR ACTIVIDADES DE UTILIZACIÓN CONFINADA CON ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

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

I. RESPONSABLES DE LA INSTALACIÓN

1) Entidad: **FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE LA SIDA-CAIXA**

Nombre: **IRSI CAIXA**

Dirección postal: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet, s/n, 08916 Badalona (España)

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Bonaventura Clotet Sala

NIF: 46.106.081 M

Cargo: Director

Tel: 93 465 63 74

Fax: 93 465 39 68

Correo electrónico: bclotet@irsicaixa.es

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Javier Martinez Picado // Nuria Izquierdo Useros

NIF: 46535782-C // 01933549-P

Cargo: Investigador senior

Tel: 93 465 63 74. Ext. 150

Fax: 93 465 93 68

Correo electrónico: jmpicado@irsicaixa.es// nizquierdo@irsicaixa.es



4) Responsable de bioseguridad de la instalación

Nombre y apellidos: Julià Blanco Arbues

NIF: 37326144L

Cargo: Investigador senior y Responsable de Prevención de Riesgos Laborales

Tel: 93 465 63 74. ext. 115

Fax: 93 465 93 68

Correo electrónico: jblanco@irsicaixa.es

5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto. Julià Blanco

6) Existencia de comités de bioseguridad y/o Comité de Seguridad y Salud:

No se considera obligatorio, pero sí recomendable, la creación de un comité de seguridad biológica. En este sentido, la Comisión Nacional de Bioseguridad ha elaborado unas directrices para la creación de un Comité de Bioseguridad en los centros que trabajan con OMG (ver Anexo 4 de la Guía). Por otro lado, se recuerda que debe constituirse un Comité de Seguridad y Salud en todas las empresas o centros de trabajo que cuenten con 50 o más trabajadores, según el artículo 38 de la Ley 31/1995, de 8 de noviembre, de prevención de riesgos laborales.

SI NO

En caso afirmativo, especificar funciones del Comité:

7) Debe señalarse si se obtiene financiación del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación para el desarrollo de las actividades propuestas. Esta información es necesaria para determinar si la instalación 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

II. DATOS GENERALES DE LA INSTALACIÓN

Deberá acompañarse un plano de situación, a escala 1:50.000 o similar, de forma que se identifique fácilmente su localización (urbana, suburbana o extraurbana).

1) Dirección de la Instalación: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. 2ª planta, Edifici Maternal. Ctra.de Canyet, s/n. 08916 Badalona. Barcelona.



- 2) Localización:
- | | | | |
|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|
| a) urbana | <input type="checkbox"/> | | |
| b) suburbana | <input type="checkbox"/> | | |
| c) extraurbana | X | i) agrícola | <input type="checkbox"/> |
| | | ii) industrial | <input type="checkbox"/> |

3) Descripción:

- | | | | |
|--------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|
| a) Edificio aislado | <input type="checkbox"/> | Nº de Secciones | <input type="checkbox"/> |
| b) Parte de un edificio | X | Nº de Secciones | 2 |
| c) Conjunto de edificios | <input type="checkbox"/> | Nº de Secciones | <input type="checkbox"/> |

- 4) Especificar el número de habitaciones de las que consta cada sección, indicando la utilización de cada una de ellas.

Laboratorio de Bioseguridad nivel 3 y sala anexa de autoclave. En el laboratorio de Bioseguridad dedicado al procesamiento y almacenamiento de muestras infecciosas (sangre, plasma, heces,...), así como a la investigación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y/o hepatitis C (VHC). En este laboratorio se manipulan concentraciones significativas de virus infecciosos.

Las 2 actividades descritas (Parte A y C) se realizarán en el laboratorio de bioseguridad de nivel 3, habilitado para manipular virus infecciosos con el nivel de seguridad requerido, cumpliendo con las directrices del real decreto RD664/1997 sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.

Sala Autoclave destinado a la recogida de material descontaminado procedente de laboratorio de bioseguridad.

III. DESCRIPCIÓN DE CADA UNA DE LAS SECCIONES DE LA INSTALACIÓN

Cumplimentar una hoja por cada una de las secciones o departamentos interesados en la notificación y las adicionales que fueran necesarias.

1) Finalidad de la sección o departamento:

- | | |
|------------------------------------|--------------------------|
| a) Laboratorio de investigación | X |
| b) Planta piloto o experimental | <input type="checkbox"/> |
| c) Planta industrial | <input type="checkbox"/> |
| d) Tratamiento después del proceso | <input type="checkbox"/> |
| e) Otro, especificar | |

2) La sección o secciones forman parte de uno o más departamentos a efectos administrativos:

SI NO X



En caso afirmativo, indicar a qué departamentos pertenecen y la finalidad de los mismos:

3) Nombre y formación del responsable de la sección:

Sección 1. Julià Blanco. Licenciado en Ciencias Químicas. Doctor en Ciencias Químicas (responsable de Prevención de Riesgos) / Lidia Ruiz, PhD (Lab Manager, Compliance Asesor)
Sección 2. Lidia Ruiz Tabuenca. Licenciada en Biología. Doctora en Medicina.

4) Descripción de las dependencias dentro de cada sección: laboratorios, cuartos de técnicas o equipos, oficinas, etc.

Se adjuntará plano de dichas dependencias: sección (es) o conjunto del edificio, a escala y con el detalle suficiente que permita apreciar las circunstancias relevantes en cada caso para la evaluación de riesgos.

Se adjuntan en anexos los planos.

Descripción

Laboratorio de Bioseguridad nivel 3 (LSB-3) y Sala anexa de Autoclave

Es la única zona de trabajo con material infeccioso. El acceso a esta zona está restringido al personal autorizado mediante una tarjeta personalizada. Únicamente se puede entrar convenientemente protegido. El interior del LSB-3 está dividido en diferentes zonas de trabajo con usos definidos. Para entrar al laboratorio de Bioseguridad se dispone de un transfer delimitado por dos zonas, una zona limpia y una zona sucia. Estas zonas están destinadas a la preparación para el acceso de personal autorizado al laboratorio de Bioseguridad con la indumentaria y EPIs adecuados. Las dos puertas de acceso como medida de control no se pueden abrir simultáneamente.

El equipamiento del Laboratorio de Bioseguridad de Nivel 3 (LSB-3) de IrsiCaixa consiste en:

- Cabinas de bioseguridad clase II (9)
- Centrífugas con buckets y tapas (6)
- Autoclave (1)
- Fluorímetro/Luminómetro (1)
- Citómetro de Flujo (LSR II BD) (2)
- Lavador de ELISAS (2)
- Lector de ELISAS (2)
- Microscopio de fluorescencia invertido (1)
- Microscopios (2)
- Separador Celular (autoMacs) (1)
- Lavador ELISPOTS (2)
- Lector de ELISPOTS (2)
- Incubadores de CO₂ (7)



- Balanza de precisión (1)
- Baños (2)
- Equipo de purificación de agua (1)
- Equipo de purificación de proteínas (1)
- Zona de Criobiología (neveras (3), congeladores -80°C (2), congeladores -30°C (2), tanque de N₂ líquido (1), ultracentrífugas (2))
- Zonas de Biología Molecular (extracción y adición de material genético) con 2 cabinas de PCR sin flujo laminar

Sala de autoclave

Destinada a la recogida de material descontaminado procedente del LSB-3 y que consta:

- Autoclave: Puerta de salida de material descontaminado procedente del LSB-3. La puerta de entrada de material infeccioso está dentro del LSB-3.
- Torno 1 o esclusa: Entrada única de material, infeccioso o no, dentro de LSB-3.



IV. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD

1) Objetivo de la actividad:

Para actividades tipo 2, 3 y 4, en la que ya se haya presentado un Formulario Tipo A, es suficiente un listado de las actividades que se van a realizar.

Construcción y caracterización de virus de la inmunodeficiencia humana con cambios sinónimos en su uso de pares de codones.

Como resultado de la redundancia del código genético, los pares de aminoácidos adyacentes pueden ser codificados por 36 pares de codones sinónimos diferentes. El sesgo en el uso de pares de codones es específico de especie, es decir, algunos pares de codones sinónimos son más o menos frecuentes de lo que cabría esperar de una distribución al azar. La introducción en el genoma viral de pares de codones sinónimos poco frecuentes produce una disminución de la capacidad replicativa de poliovirus, virus de la influenza y el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). Sin embargo, el mecanismo de atenuación no se sabe con certeza. Del mismo modo, no está claro si los virus recodificados son estables in vivo. Nosotros proponemos aquí investigar en qué medida el sesgo en el uso de pares de codones afecta a la capacidad replicativa del VIH-1 así como el efecto que produce en su capacidad evolutiva y patogénesis. En particular, vamos a explorar el posible efecto del uso de pares de codones en la traducción de los mensajeros del VIH-1. Además, también estudiaremos la estabilidad de los virus recodificados y su utilidad como una herramienta para identificar elementos redundantes de ARN funcionales presentes en el genoma del VIH-1. Debido a que este método va dirigido a una función elemental como es la traducción, nuestra hipótesis es que el sesgo en el uso de pares de codones puede tener una aplicación general y servir para alterar el fenotipo de otros virus u otros organismos.

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 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 2 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 3 | X |
| Tipo 4 | <input type="checkbox"/> |

3) Descripción de las operaciones:

3.1. Microorganismos:

| | | |
|-------------------------|--------------------------|----------------------|
| a) escala experimental | X | Volumen máximo:15 ml |
| b) escala prueba piloto | <input type="checkbox"/> | Volumen máximo: |
| c) escala industrial | <input type="checkbox"/> | Volumen máximo: |

Los stocks virales de VIH-1 NL4-3 (máximo 15 ml) se almacenarán en viales de 1 ml y tendrán una concentración máxima de antígeno viral p24 de 1200 ng.



3.2. Número de Plantas: No Aplica

3.3. Número de Animales: No Aplica

4) Periodo estimado de duración 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).

La duración del proyecto será de tres años, comenzando el 1 de enero de 2017 y terminando el 31 de diciembre de 2019.

5) Tipo de proceso biológico, para el caso de microorganismos modificados genéticamente:

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------|
| a) Cultivo continuo en fermentador | <input type="checkbox"/> |
| b) Cultivo discontinuo en fermentador | <input type="checkbox"/> |
| c) Otros | X |

La recodificación del genoma viral se realizará mediante la síntesis química de los fragmentos recodificados. Estos fragmentos recodificados se transfectarán en células MT-4 junto con los fragmentos genómicos virales que faltan para completar el genoma completo del VIH-1. Estos últimos fragmentos, recodificados o portadores de la secuencia salvaje del virus, también procederán de una síntesis química, evitándose la utilización de plásmidos bacterianos que contengan clones infecciosos del VIH-1 y las metodologías clásicas de la biología molecular que implican la utilización de enzimas de restricción o de ligación. Los variantes sintéticos que se generarán tendrán como referencia la secuencia de nucleótidos del virus de referencia NL4-3. Los fragmentos del genoma viral sintéticos se generarán mediante la recombinación por PCR de oligonucleótidos sintéticos (Integrated DNA Technologies) como previamente hemos descrito. Como se ha mencionado en la parte A, se generarán virus infecciosos mediante la transfección en células susceptibles de fragmentos de PCR solapantes que contengan toda la secuencia genómica del DNA proviral del VIH-1. Brevemente, 500 ng de PCRs purificados se electroporarán en células MT-4 como previamente hemos descrito (ver copias de los trabajos que se adjuntan). Los sobrenadantes de los cultivos celulares transfectados se recogerán a los 3, 5 y 7 días postransfección. La presencia de virus en los sobrenadantes de los cultivos se determinará mediante la cuantificación del antígeno viral p24 (Genscreen HIV-1 Ag assay, Bio-Rad). El título de infectividad viral de los sobrenadantes de los cultivos positivos para el antígeno p24 (tissue culture dose for 50% infectivity, TCID50) se realizará en células MT-4 tal como hemos descrito previamente.

6) Origen del OMG: indicar si el OMG procede de otro centro o empresa (señalar nombre y ubicación), y si es así, si dicho centro o empresa está registrado conforme a la normativa española y/o europea vigente sobre OMG:

El OMG se genera en nuestra instalación.

Se generarán virus infecciosos mediante la transfección en células MT-4 de fragmentos de PCR solapantes que contengan toda la secuencia genómica del DNA proviral del VIH.



7) Información sobre el transporte de los OMG en el caso de que provengan de, o se destinen a otros centros o instalaciones, así como descripción de las medidas adoptadas durante el mismo en virtud de la legislación aplicable² (tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado).

No aplica.

V. **MEDIDAS DE CONFINAMIENTO Y OTRAS MEDIDAS DE PROTECCIÓN APLICADAS**

El objetivo de este apartado es la descripción completa de las condiciones de la instalación, con objeto de que la Comisión Nacional de Bioseguridad pueda evaluar si se garantiza el grado de confinamiento exigido por la legislación (ver anexo 3 de la Guía, que recoge el anexo II del Real Decreto 178/2004).

Si procede, se cumplimentará una hoja por cada una de las distintas secciones o departamentos interesados en la notificación. En ningún caso se aceptará que en un mismo formulario Parte B se incluyan distintos niveles de confinamiento.

| I.- LABORATORIOS | | |
|--|--|-----------|
| | SÍ | NO |
| El laboratorio se encuentra separado de otras zonas del mismo edificio | X | |
| El laboratorio se encuentra en un edificio independiente | | X |
| El laboratorio es hermético, permitiendo que se fumigue | X | |
| Existencia de una entrada y salida independientes | | X |
| Mobiliario y equipos | SÍ | NO |
| Superficies resistentes a agentes de descontaminación y de fácil limpieza | X | |
| Acceso al laboratorio a través de una esclusa | X | |
| Presión negativa respecto a la presión del medio ambiente inmediato | X | |
| Aire de entrada y de salida del laboratorio tratado con filtros HEPA | X | |
| <ul style="list-style-type: none"> Indicar el tipo de filtro HEPA: | Filtros absolutos de eficacia H13. | |
| Cabina de seguridad biológica | X | |
| <ul style="list-style-type: none"> Indicar el tipo y localización de la/s cabinas de seguridad biológica: | Cabina de seguridad flujo laminar clase II tipo A2 | |

² 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.

| | | |
|--|---|-----------|
| | | |
| Autoclave | X | |
| <ul style="list-style-type: none"> Indicar la localización del autoclave (dentro del edificio; dentro del laboratorio, en otra dependencia de la instalación) | "Sala Autoclave" anexa al laboratorio de Bioseguridad nivel 3, con puerta de entrada en el laboratorio de Bioseguridad nivel 3 y puerta de salida en la "sala autoclave". | |
| Normas de trabajo | SÍ | NO |
| Acceso restringido | X | |
| <ul style="list-style-type: none"> ¿Cómo se restringe el acceso? (ej. entrada mediante tarjeta del personal autorizado) | Acceso con sistema biométrico digital de huella tanto en la entrada principal como en el acceso al transfer/esclusa, previa autorización de la Institución. | |
| Señalización de peligro biológico en la puerta | X | |
| Señalización de peligro biológico en el equipamiento que aloja material biológico | X | |
| Medidas específicas para evitar la formación y difusión de aerosoles | X | |
| Indumentaria de protección | X | |
| <ul style="list-style-type: none"> Indicar qué indumentaria de protección y EPIs se utilizan | Batas quirúrgica desechables, gafas de protección, calzado cerrado, mascarilla, polainas, pantallas protectoras, delantal | |
| Lavado de la ropa de trabajo | X | |
| <ul style="list-style-type: none"> Indicar quien es responsable del lavado de la ropa de trabajo (empresa gestora; en la propia instalación) | Las batas blancas para el trabajo en el laboratorio central las gestiona el HUGTiP encargándose además del lavado. La indumentaria de trabajo obligatoria en el LSB-3 es desechable de un solo uso. | |
| Espacio específico para la ropa de trabajo (percheros; taquillas) | X | |
| Cambio de ropa y calzado antes de entrar y salir de la instalación | | X |
| El personal está obligado a ducharse antes de abandonar la zona controlada | | X |
| Control eficaz de roedores e insectos | X | |



| Residuos | SÍ | NO |
|---|-----------|--|
| Inactivación de los OMG presentes en el material sólido contaminado mediante el uso de autoclave. | X | |
| Eliminación de los OMG presentes en medios líquidos en los efluentes de los desagües previa inactivación, durante al menos 24 horas, mediante el uso de desinfectante amplio espectro. En el caso de la eliminación de placas de cultivo, a éstas previamente se les añade desinfectante (Safe-Sept) y al día siguiente se autoclavan. | | X Inactivación previa a la eliminación. |
| Otras medidas | SÍ | NO |
| Material para la recogida de posibles vertidos (vermiculita; papel absorbente) disponible en la zona de trabajo | X | |
| Almacenamiento de material fungible y reactivos en el propio laboratorio | X | |
| Ventana de observación o similar para ver a los ocupantes | X | |

| II.- INVERNADEROS Y SEMILLEROS | | |
|--|-----------|-----------|
| NO APLICA | SÍ | NO |
| Invernaderos: estructura permanente | | |
| La pendiente permite evitar la entrada de la escorrentía de aguas superficiales | | |
| Puertas de cierre automático. | | |
| Equipo | SÍ | NO |
| Entrada a través de una esclusa con dos puertas con cerradura dependiente | | |
| Control y gestión de aguas contaminadas | | |
| Normas de trabajo | SÍ | NO |
| Medidas para controlar las especies no deseadas (insectos y otros artrópodos, roedores, etc.) | | |
| Procedimientos para evitar la diseminación de OMG durante el transporte de material vivo entre el invernadero o semillero, la estructura protectora y el laboratorio | | |

| III.- UNIDADES DE ANIMALES | | |
|--|-----------|-----------|
| NO APLICA | SÍ | NO |
| Aislamiento en la unidad de animales (1) | | |
| Locales de animales (2) separados mediante puertas bloqueables | | |



| | | |
|--|--|--|
| Locales de animales diseñados para la descontaminación: material impermeable y fácil de lavar | | |
| Suelo y paredes fáciles de lavar | | |
| Confinamiento de los animales en receptáculos adecuados como jaulas, corrales o cajas | | |
| Filtros en las cajas de aislamiento o habitaciones aisladas | | |
| <ul style="list-style-type: none"> Indíquese los métodos de control de posibles escapes que se emplean: | | |

- (1) Unidad de animales: edificios o zonas separadas de un edificio que disponga de locales y otras zonas como vestuarios, duchas, autoclaves, almacén de alimentos, etc.
- (2) Locales de animales: locales que habitualmente se emplean para alojar animales de reserva, cría o experimentación o para realizar pequeñas intervenciones quirúrgicas.

| IV.- OTRAS ACTIVIDADES | | |
|---|-----------|-----------|
| NO APLICA | SÍ | NO |
| Los organismos viables deben mantenerse en un sistema que separe el proceso del entorno (sistema cerrado) | | |
| Control de los gases de escape del sistema cerrado | | |
| Control de aerosoles durante la toma de muestras, la introducción de material en un sistema cerrado o la transferencia de material a otro sistema cerrado | | |
| Inactivación del líquido de cultivo en masa antes de extraerlo del sistema cerrado | | |
| Sistemas de cierre diseñados para minimizar o evitar la liberación | | |
| Zona controlada con capacidad para contener el vertido de todo el contenido del sistema cerrado | | |
| Zona controlada hermética para fumigación | | |
| Equipo | SÍ | NO |
| Entrada a través de esclusa | | |
| Superficies resistentes a ácidos, álcalis, disolventes, desinfectantes y agentes de descontaminación, y de fácil limpieza | | |
| Medidas específicas para ventilar adecuadamente la zona controlada y de este modo minimizar la contaminación atmosférica | | |
| Zona controlada con presión negativa respecto a la presión circundante | | |
| Tratamiento del aire de salida y entrada de la zona filtrado con filtros HEPA | | |



| Normas de trabajo | SÍ | NO |
|--|-----------|-----------|
| Sistemas cerrados situados en una zona controlada | | |
| Acceso restringido exclusivamente al personal autorizado | | |
| Obligación de indicar el peligro biológico | | |
| El personal deberá ducharse antes de abandonar la zona controlada | | |
| Indumentaria de protección para el personal | | |
| Residuos | SÍ | NO |
| Inactivación de los OMG en los efluentes de lavabos y duchas o efluentes similares | | |
| Inactivación de los OMG en el material contaminado y los residuos, incluidos los OMG presentes en el efluente de trabajo antes del vertido final | | |

1) Adjuntar documentación relativa a protocolos de uso, validación y revisión periódica de equipos e instalaciones.

Se adjunta anexos de protocolos de uso, validación y revisión periódica de equipos e instalaciones.

2) Indicar que otras normas internas (PNT) se aplican, tanto a la instalación como a la actividad o actividades que se desarrollan (exposición a agentes biológicos, experimentación con animales, gestión y eliminación de residuos, etc.)

Seguridad para la Salud. Normativas.

Laboratorio de Bioseguridad nivel 3 que consta de:

- Mobiliario específico de laboratorio con superficies no porosas, resistentes y fáciles de limpiar.
- Área con suelo y techos estancos preparados para trabajar con organismos patógenos tipo 3
- Presión negativa. Medidor de presión.
- Transfer o antesala con dos áreas definidas para la entrada a LSB-3
- Uso de equipos de protección individual y colectiva
- Cabinas de bioseguridad clase II tipo A/B3
- Autoclave para la descontaminación de residuos infecciosos y no infecciosos generados en LSB-3.
- Centrífugas con buckets y tapas selladas para la contención de aerosoles.
- Gestión de Residuos según las normas internas de Gestión de Residuos del HGTiP.
- Fichas Técnicas de Reactivos Químicos. Armarios específicos para el almacenaje de los Reactivo en laboratorio 2 (Laboratorio central).
- Cabina de gases (Laboratorio central).
- Protocolos de Prevención de Riesgos en caso de accidentes/incidentes.



VI. **PLANES DE EMERGENCIA**

Se deberá cumplimentar para todos los casos excepto para operaciones de utilización confinada de Tipo 1.

1) Información sobre prevención de accidentes y planes de actuación en situaciones de emergencia.

Se adjunta anexos y documentos relativos:

- *Medidas de Seguridad (Manual de acogida IrsiCaixa 2016)*
 - *Anexo I. Equipos de Protección Individual (EPIs)*
 - *Anexo II. Uso seguro de equipos de laboratorio*
 - *Anexo III. Prevención y Actuación en la manipulación de material infeccioso*
 - *Anexo V. Accidentes*
- *Plan de emergencia IrsiCaixa (Manual de acogida IrsiCaixa 2016)*
 - *Plan de emergencia IrsiCaixa*
 - *Consignas Pau HIGTiP*
 - *Normativa interna – ICS*
 - *Prevenió de Riscos laborals a l'ICS*
 - *PR-ACCIN-01. IRSICAIXA_Proced_inv_accid.*
 - *Medidas de Seguridad para la salud. Control de riesgos físicos. Tipos de accidente.*
- *Plan de prevención de RL. Derechos y Obligaciones (Manual de acogida IrsiCaixa 2016)*
- *Plan de Prevención IrsiCaixa (Manual de acogida IrsiCaixa 2016)*

2) Para instalaciones en las que se vayan a llevar a cabo operaciones de utilización confinada de tipo 3 y 4, deberá adjuntarse además la siguiente información:

a) Riesgos específicos y potenciales debidos al emplazamiento.

El laboratorio está dentro de un Hospital extraurbano y no linda con otros departamentos o servicios del hospital. No hay ingresos hospitalarios en el área donde están los laboratorios IrsiCaixa incluyendo el LSB-3. La ubicación del laboratorio donde se desarrolla la actividad, el tipo de instalación y las medidas de seguridad implantadas cumplen los criterios descritos por la Organización mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad de laboratorio. Ginebra 2005 minimizando los riesgos potenciales.

b) Medidas preventivas aplicadas, tales como equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento.

Instalaciones/Equipos

- Presión negativa visible en la entrada al LSB-3.
- Transfer/esclusa
- Congeladores -80°C conectados a un sistema de alarma (Sirius).
- Cabinas clase II tipo A con alarma
- Centrífugas con buckets y tapas selladas
- Autoclave con alarma
- Sistema de alarma de entrada y salida personal
- Cámaras de seguridad

Equipos de protección individual y colectiva

- Guantes. CE Cat. III
- Mascarilla quirúrgica. CE- EN 14683. Cat. II
- Batas quirúrgicas de protección de un solo uso. CE 0086



- Polainas quirúrgicas
- Pantalla protección
- Guantes termoprotectores. EN 407 y EN 388
- Guantes específicos antipinchazo y cortes. Ca. II EN 388 – EN 420
- Delantal termo protector. EN 511; Cat. III.
- Calzado cerrado. CE, norma EN-ISO-20347

c) Procedimientos y planes de comprobación de la eficacia permanente de las medidas de confinamiento.

Actividad del Supervisión interna

- Supervisor
- Responsable de riesgos laborales

Empresas específicas para realizar el:

- mantenimiento de las instalaciones del LSB-3 (clima, presión negativa, instalación eléctrica, puertas de emergencia,...).
- mantenimiento y calibración de equipos (cabinas de seguridad, centrífugas, baños, incubadores y pequeño equipamiento).
- mantenimiento ultracentrífuga.
- mantenimiento de autoclaves.

d) Descripción de la información suministrada a los trabajadores.

- Dossier de Bienvenida
- Normativa de seguridad e higiene del laboratorio de bioseguridad
- Normativa de seguridad e higiene del laboratorio central
- Gestión de residuos siguiendo las directrices del hospital y del ICS
- Transporte de sustancias infecciosas
- Plan de emergencia interno y del ICS
- Plan de Prevención

d) Información necesaria para que la autoridad competente pueda evaluar los planes de respuesta en situación de emergencia elaborados de conformidad con el artículo 14 de la Directiva 98/81/CE.



PARTE C

DIRECCION GENERAL DE
CALIDAD Y EVALUACION
AMBIENTAL Y MEDIO NATURAL

COMISIÓN NACIONAL DE
BIOSEGURIDAD

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

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

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

5) Entidad: **FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE LA SIDA-CAIXA**

Nombre: **IrsiCaixa**

Dirección postal: Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet, s/n, 08916 Badalona (España)

2) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Bonaventura Clotet Sala

NIF: 46.106.081 M

Cargo: Director

Tel: 93 465 63 74

Fax: 93 465 39 68

Correo electrónico: bclotet@irsicaixa.es

3) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Miguel Angel Martínez de la Sierra

NIF: 02507914-V

Cargo: Investigador Senior

Tel: 934656374 ext 106

Fax: 934653968

Correo electrónico: mmartinez@irsicaixa.es

4 Nombre y apellidos: Julià Blanco Arbues

NIF: 37326144L

Cargo: Investigador senior y Responsable de Prevención de Riesgos Laborales



Tel: 93 465 63 74. ext. 115
Fax: 93 465 93 68
Correo electrónico: jblanco@irsicaixa.es

5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto. Julià Blanco

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

1. Objetivo de la actividad:

Construcción y caracterización de virus de la inmunodeficiencia humana con cambios sinónimos en su uso de pares de codones

Como resultado de la redundancia del código genético, los pares de aminoácidos adyacentes pueden ser codificados por 36 pares de codones sinónimos diferentes. El sesgo en el uso de pares de codones es específico de especie, es decir, algunos pares de codones sinónimos son más o menos frecuentes de lo que cabría esperar de una distribución al azar. La introducción en el genoma viral de pares de codones sinónimos poco frecuentes produce una disminución de la capacidad replicativa de poliovirus, virus de la influenza y el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1). Sin embargo, el mecanismo de atenuación no se sabe con certeza. Del mismo modo, no está claro si los virus recodificados son estables in vivo. Nosotros proponemos aquí investigar en qué medida el sesgo en el uso de pares de codones afecta a la capacidad replicativa del VIH-1 así como el efecto que produce en su capacidad evolutiva y patogénesis. En particular, vamos a explorar el posible efecto del uso de pares de codones en la traducción de los mensajeros del VIH-1. Además, también estudiaremos la estabilidad de los virus recodificados y su utilidad como una herramienta para identificar elementos redundantes de ARN funcionales presentes en el genoma del VIH-1. Debido a que este método va dirigido a una función elemental como es la traducción, nuestra hipótesis es que el sesgo en el uso de pares de codones puede tener una aplicación general y servir para alterar el fenotipo de otros virus u otros organismos.

2. Duración prevista de la actividad:

La duración del proyecto será de tres años, comenzando el 1 de enero de 2017 y terminando el 31 de diciembre de 2019.

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.

El organismo receptor es el VIH-1 NL4-3 (ver características en la parte A), el cual tiene un tropismo exclusivamente humano. El virus replica en células del sistema inmune que expresan el receptor CD4 y los correceptores CCR5 o CXCR4. Estas células son fundamentalmente linfocitos T CD4 positivos que se encuentran tanto en tejido linfoide como en la sangre periférica de los individuos infectados. La patogénesis asociada a la infección con el VIH se manifiesta por el aumento de la carga viral en el plasma de sangre periférica y en la pérdida progresiva de células CD4 positivas. Cuando se alcanza una pérdida crítica de los niveles de estas células CD4 positivas aparecen un determinado número de infecciones oportunistas que desencadenan el denominado SIDA.

b) Organismo donante.

El organismo donante es también el VIH-1. Decodificaremos el genoma completo del VIH-1, es decir, las regiones codificantes *gag*, *pol* y *env*. Se recodificará sinónimamente el uso de codones o pares de codones y/o las frecuencias de los dinucleótidos CpG y UpA. En función del tamaño del fragmento genómico recodificado, se generarán variantes que contengan decenas, cientos o miles de sustituciones sinónimas. La generación de virus mutantes se realizará sobre la secuencia del genoma del virus de referencia NL4-3 (GenBank: AF324493.2) (ver secuencia en el apartado del organismo receptor de la parte A).

c) Inserto.

El inserto corresponde al DNA proviral completo del VIH-1 NL4-3 (GenBank: AF324493.2) (ver párrafo anterior), el cual dirige la síntesis de partículas infecciosas del VIH-1 y por lo tanto su manejo está confinado en nuestras instalaciones de bioseguridad LBS-3. La secuencia y mapa genético del VIH-1 empleado se muestran en la parte A.

d) Vector.

Como se ha mencionado en el parte A no utilizaremos ningún vector que contenga el DNA proviral del VIH-1. La recodificación del genoma viral se realizará mediante la síntesis química de los fragmentos recodificados [Cello et al 2002. Science 297, 1016-1018]. Estos fragmentos recodificados se transfectarán en células susceptibles (e.g. células MT-4) junto con los fragmentos genómicos virales que falten para completar el genoma completo del VIH-1 [Fujita et al 2013. Virology 436, 100-111]. Estos últimos fragmentos, recodificados o portadores de la secuencia salvaje del virus, también procederán de una síntesis química, evitándose la utilización de plásmidos bacterianos que contengan clones infecciosos del VIH-1 y las metodologías clásicas de la biología molecular que implican la utilización de enzimas de restricción o de ligación.

e) Organismo modificado genéticamente resultante.

El organismo modificado genéticamente resultante serán VIH-1 recodificados sinónimamente a lo largo de todo su genoma.

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

El VIH-1 es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El VIH es un microorganismo que ataca al sistema Inmune de las personas, debilitándolo y haciéndoles vulnerables ante una serie de infecciones, algunas de las cuáles pueden poner en peligro la vida. El SIDA es el estado de la infección por el VIH caracterizado por bajos niveles de defensas y la



aparición de infecciones oportunistas. El VIH se transmite a través de los siguientes fluidos corporales: sangre, semen, secreciones vaginales y leche materna. En la actualidad existen medicamentos, denominados antirretrovirales, que inhiben enzimas virales esenciales como la transcriptasa en reverso, la proteasa y la integrasa u otras proteínas virales bloqueando de esta manera la replicación del VIH. La utilización de antirretrovirales detiene la progresión de la enfermedad y el SIDA aunque no son capaces de eliminar el virus, siendo por tanto necesario su administración durante toda la vida del paciente infectado.

g) Efectos para el medio ambiente.

No se han descrito.

2. Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

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

| | |
|--------|--------------------------|
| Tipo 1 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 2 | <input type="checkbox"/> |
| Tipo 3 | X |
| Tipo 4 | <input type="checkbox"/> |

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

a) Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental).

La manipulación se realizará siempre en cabinas de bioseguridad clase II tipo A, centrífugas con buckets y tapas de seguridad y dentro del laboratorio de bioseguridad (LSB-3) con las características de una instalación recomendadas (Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, Ginebra 2005) para trabajar con organismos patógenos de tipo 3 (VIH/VHC). Por tanto, las medidas de confinamiento y control son las adecuadas.

b) Concentración y escala utilizadas.

Los stocks virales de VIH-1 NL4-3 (máximo 15 ml) se almacenarán en viales de 1 ml y tendrán una concentración máxima de antígeno viral p24 de 1200 ng.

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).

Todo el procedimiento se llevará a cabo dentro de las instalaciones de bioseguridad LSB-3 de la Fundación IrsiCaixa. La recodificación del genoma viral se realizará mediante la síntesis química de los fragmentos recodificados. Estos fragmentos recodificados se transfectarán en células MT-4 junto con los fragmentos genómicos virales que faltan para completar el genoma completo del VIH-1. Estos últimos fragmentos, recodificados o portadores de la secuencia salvaje del virus, también procederán de una síntesis química, evitándose la utilización de plásmidos bacterianos que contengan clones infecciosos del VIH-1 y las metodologías clásicas de la biología molecular que implican la utilización



de enzimas de restricción o de ligación. Los variantes sintéticos que se generarán tendrán como referencia la secuencia de nucleótidos del virus de referencia NL4-3. Los fragmentos del genoma viral sintéticos se generarán mediante la recombinación por PCR de oligonucleótidos sintéticos (*Integrated DNA Technologies*) como previamente hemos descrito. Como se ha mencionado en la parte A, se generarán virus infecciosos mediante la transfección en células susceptibles de fragmentos de PCR solapantes que contengan toda la secuencia genómica del DNA proviral del VIH-1. Brevemente, 500 ng de PCRs purificados se electroporarán en células MT-4 como previamente hemos descrito (ver copias de los trabajos que se adjuntan). Los sobrenadantes de los cultivos celulares transfectados se recogerán a los 3, 5 y 7 días postransfección. La presencia de virus en los sobrenadantes de los cultivos se determinará mediante la cuantificación del antígeno viral p24 (*Genscreen HIV-1 Ag assay*, Bio-Rad). El título de infectividad viral de los sobrenadantes de los cultivos positivos para el antígeno p24 (*tissue culture dose for 50% infectivity*, TCID50) se realizará en células MT-4 tal como hemos descrito previamente.

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

No se contempla el almacenamiento definitivo ni confinación de los variantes estudiados. Únicamente se conservarán *in silico* las secuencias de DNA de los diferentes virus infecciosos, los cuales, siempre podremos a volver a generarlos mediante síntesis química. Después de recoger los stocks virales en alícuotas de 1 ml, todo el material utilizado se esteriliza antes de su salida del laboratorio de bioseguridad LSB-3.

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.)

La ubicación del Laboratorio de Bioseguridad se indica en los planos adjuntos (*Plano 1_planta situación Lab IrsiCaixa / Plano 2 _ Laboratorio LSB-3/ Plano 3_Salidas general emergencia/ Plano 4. Puertas emergencia y extintores LSB-3 /Plano 5. Puertas emergencia y extintores LAB. CENTRAL/Mapa Fundación IrsiCaixa*). El laboratorio no linda con ningún departamento del Hospital Germans Trias i Pujol (HGTiP).

Está situado en la 2ª planta del edificio maternal del HGTiP. En esta área del edificio no hay ingreso de pacientes. Las entradas están señalizadas con el símbolo de riesgo biológico.

Las conducciones de aire son independientes del resto de laboratorios. El laboratorio dispone de presión negativa y filtro absolutos Hepa H13. Además, dispone de una antesala con doble puerta en la que la apertura de las mismas nunca es simultánea.

El acceso al laboratorio de Bioseguridad es restringido solo a personal autorizado siendo el sistema de entrada biométrico mediante reconocimiento de huella digital.

La temperatura de los laboratorios es de 21°C para el buen funcionamiento de los equipos y el confort de los trabajadores.

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

Intrusión. El acceso al laboratorio de Bioseguridad y resto de laboratorios es restringido accediendo solo personal autorizado mediante sistema biométrico de huella digital. Existe un control de movimiento mediante cámaras de seguridad y un sistema de alarma de entrada y salida conectado en horarios no laborales, festivos y fin de semana.

Derrame de material biológico infeccioso. En caso de producirse un derrame, la mayor probabilidad es que ocurra dentro de una cabina de bioseguridad pudiendo afectar a los trabajadores del



laboratorio de bioseguridad. Más improbable es que ocurra un derrame fuera de la cabina aunque siempre sería dentro del laboratorio de Bioseguridad. Esta incidencia podría ocurrir en caso de caída accidental durante el traslado de placas a un incubador. Ante cualquiera de estos casos existe un procedimiento de actuación incluido en la normativa de la institución al alcance de todos los trabajadores (*Anexo III. SG-PR-03. Prevención y actuación en la manipulación de material infeccioso. Derrames. punto 5.3 / Anexo V. SG-PR-05. Accidentes. punto 5.5.*). Esta documentación se halla dentro del Manual de Acogida IrsiCaixa 2016. 5. Medidas de Seguridad).

Uso inadecuado de equipos de riesgos. Se podría producir un accidente ante el uso impropio de determinados equipos (cabinas de bioseguridad, autoclave, centrífugas, tanques nitrógeno). Al trabajador se le proporciona la normativa de trabajo, seguridad e higiene que incluye el uso adecuado de los equipos. Se dispone del manual de uso de todos los equipos en papel y en pdf. (*ANEXO II. SG - PR-02. Medidas de Seguridad. punto 5. Prevención y actuación en la manipulación de material infeccioso. Uso seguro de equipos de laboratorio. punto 5.2.*). Anualmente se imparte un curso formativo en riesgo laboral adaptado a nuestra actividad, instalaciones y equipos.

Emisión de agentes infecciosos.

Interior del área de contención. La probabilidad de que se produzca emisiones es muy baja dado que todo material infeccioso se manipula dentro de las cabinas de clase II. Podría ocurrir un fallo del funcionamiento de la cabina de seguridad, y en tal caso se activaría una alarma acústica que indica fallo de funcionamiento. La producción de aerosoles, es un hecho bastante improbable en nuestras actividades, excepto quizás durante el uso de las centrífugas. Para evitar este riesgo se trabaja siempre con buckets con tapas selladas y así evitar accidentes de salpicaduras, emisión de aerosoles o rotura de tubos. No obstante, hay que remarcar que nuestro instituto centra su trabajo en la investigación del VIH/VHC siendo estos patógenos no transmisibles por vía aérea.

Interior del área de contención. Es improbable dado que únicamente se extrae material infeccioso (siempre congelado y en contenedores de seguridad) fuera del laboratorio de bioseguridad para realizar envíos a otros centros donde hay establecidas colaboraciones. Todo material infeccioso del laboratorio de Bioseguridad a eliminar es previamente descontaminado mediante la autoclave.

Accidentes. En nuestro caso haría referencia a la exposición de un agente infeccioso mediante principalmente la entrada por vía percutánea (pinchazos, cortes o contacto con piel no intacta) o por salpicaduras a mucosas. Nuestra actividad actualmente no hace uso de material punzante. (*Anexo V. SG-PR-05. Medidas de Seguridad. punto 5. Prevención y actuación en la manipulación de material infeccioso. Accidentes. punto 5.5.*).

Derrames de productos químicos. Las sustancias químicas utilizadas en el laboratorio de Bioseguridad son soluciones que por su concentración no entrañan peligro para la salud.

Incendio u otro tipo de emergencia que puedan ocasionar daños estructurales en LSB-3. En el laboratorio se estima una carga térmica de fuego baja.

Un incendio puede deberse a un fallo eléctrico de la instalación. La instalación eléctrica tiene sistema de seguridad en caso de fallos eléctricos.

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

Intrusión. El acceso la LSB-3 y resto de laboratorios es restringido. Acceso mediante sistema biométrico de huella digital. Existen cámaras de vigilancia y sistema de alarma de entrada/salida fuera activado fuera del horario laboral, festivos y fines de semana.

Derrame de material biológico infeccioso en el LSB-3/Emisión de agentes biológicos. La mayor probabilidad de que ocurra este incidente sería dentro de una cabina de bioseguridad. La instalación y los equipos son los adecuados para la contención y seguridad de los trabajadores y medio ambiente.



Detalle:

Instalación

- Presión negativa. Medidor de presión en la entrada del LSB-3
- Antesala con doble puerta
- Filtros absolutos Hepas H13

Equipos de laboratorio de contención

- Cabina de bioseguridad clase II tipo A con alarma acústica.
- Centrífugas con buckets y tapas de seguridad
- Autoclave con alarma acústica

Equipos de protección individual y colectiva

- Guantes. CE Cat. III
- Mascarilla quirúrgica. CE- EN 14683. Cat. II
- Batas quirúrgicas de protección. CE 0086
- Polainas quirúrgicas
- Pantalla protección
- Guantes termoprotectores. EN 407 y EN 388
- Guantes específicos antipinchazo y cortes. Ca. II EN 388 – EN 420.
- Delantal termo protector.
- Calzado cerrado. CE, norma EN-ISO-20347

Accidentes

Además de la obligatoriedad del uso de una indumentaria adecuada para acceder y trabajar en el LSB-3, se dispone de:

- Lavaojos y una ducha de emergencia
- Lavamanos específico en la antesala en caso de accidente
- Botiquín con material básico para primeros auxilios en la antesala
- Manual de procedimiento para el trabajo, higiene y salud
- Curso formativo de seguridad a todo nuevo trabajador
- Curso formativo anual en materia de prevención de riesgos laborales adaptado a nuestra actividad y tipo de instalación

Incendio u otro tipo de emergencia que puedan ocasionar daños estructurales en LSB-3.

- Detectores de humos conectados con la central de alarma del HGTiP
puertas de entradas conectadas al sistema la central de alarma del HGTiP
- Extintores de fuego (2 de CO2 y 2 de polvo)
- Puerta de emergencia en caso de evacuación rápida

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

Se adjunta protocolo interno de actuación en caso de emergencia en los laboratorios de IrsiCaixa y evacuación del edificio donde se describen los planes de emergencia y la normativa aplicada por el Instituto catalán de salud y del HGTiP.



DOCUMENTOS

- *Plan de emergencia IrsiCaixa (punto 6. dentro de la carpeta de Manual de acogida IrsiCaixa 2016)*
 - *Plan de emergencia IrsiCaixa*
 - *Consignas Pau HGTIP (punto 6.2)*
 - *Normativa interna – ICS (punto 6.3.)*
 - *Prevenió de Riscos laborals a l'ICS (punto 6.4.)*
 - *PR-ACCIN-01. IRSICAIXA_Proced_inv_accid.*
 - *SG-PR-05. Medidas de Seguridad para la salud. Control de riesgos físicos. Tipos de accidente.*