



## Los vectores virales y su relación con la bioseguridad en el laboratorio

**>>>** Un vector viral es un virus modificado que hace de vehículo para introducir material genético exógeno en el núcleo de una célula. La terapia génica, es ampliamente usada en el laboratorio de biología molecular y microbiología, por lo que es fundamental implementar correctas medidas de bioseguridad, para proteger de exposiciones no intencionales a estos agentes biológicos, no solo al personal que trabaja en el laboratorio sino también a la población en general. En la siguiente revisión se incluyen definiciones, generalidades y consideraciones sobre los niveles de bioseguridad necesarios, y los vectores más usados.

### **>>> AUTORES**

Catalina S. Romano<sup>1</sup>, Susana Esther Mersich<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Licenciada en Ciencias Químicas. Especialista en Higiene y Seguridad en el Trabajo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. Servicio de Higiene y Seguridad en el Trabajo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

<sup>2</sup> Doctora en Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA. IQUBICEN - Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

\* Servicio de Higiene y Seguridad. Facultad de Ciencias

Exactas y Naturales. UBA. Pabellón 2. Ciudad Universitaria. Av. Intendente Güiraldes 2160. (1428) Ciudad de Buenos Aires. Argentina.

### **>>> CORRESPONDENCIA**

Lic. CATALINA ROMANO  
Servicio de Higiene y Seguridad  
Av. Intendente Güiraldes 2160 Pab. 2 Ciudad Universitaria  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.  
Tel.: 054-11-5285-8173  
E-mail: catalina.romano@de.fcen.uba.ar

Publicado en Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Incorporada al Chemical Abstract Service

## >>> RESUMEN

Los vectores virales constituyen un amplio grupo de agentes usados en los laboratorios de biología molecular y microbiología, para transferir ácido nucleico externo dentro de una célula “blanco”. Estos laboratorios requieren medidas de bioseguridad para proteger al personal, el ambiente de trabajo y la población en general de exposiciones no intencionales a estos agentes biológicos. Esta revisión incluye definiciones y generalidades sobre los vectores más usados, así como consideraciones sobre los niveles de bioseguridad necesarios, teniendo en cuenta tanto la constitución genética del vector original, como el tipo de inserto que se quiera clonar y expresar en una determinada célula. Además se describen diferentes propiedades de los vectores como el tropismo, las distintas formas de transmisión, la estabilidad del agente viral y su persistencia, que resultan claves para determinar el grupo de riesgo. Dentro de las condiciones de trabajo adecuadas se incluyen medidas de contención, ensayos de riesgo

ambiental y una breve descripción de la biocustodia. Finalmente se destaca el papel de los Comités de Bioseguridad Institucional, como elemento crítico en las actividades necesarias para impedir las exposiciones y proteger al personal del laboratorio y al medio ambiente.

**Palabras clave:** vectores virales \* bioseguridad \* rango de huésped \* transmisión \* biocustodia \* exposiciones

## >>> INTRODUCCIÓN

Una de las propiedades más eficientes de los virus es la utilización de la maquinaria celular, como el proceso de síntesis de proteínas, para producir las nuevas partículas virales. El avance en el conocimiento de la biología molecular ha permitido usar esta propiedad para desarrollar vectores que pueden transportar genes de interés terapéutico, usados en la fabricación de vacunas más seguras y económicas o en procedimientos de terapia génica. Un vector viral (VV) está constituido por un virus cuyo material genómico ha sido modificado con una



## Análisis Multidisciplinarios de Alta Complejidad de Bahía Blanca para todo el país

- Clínico Humano
- Bromatológico
- Veterinario
- Agronómico
- Bioanalítica
- Industrial y Medio Ambiente



Full ISO 9001:2008  
Acreditado por IR 08001

Asociación Laboratorios de Alta Complejidad

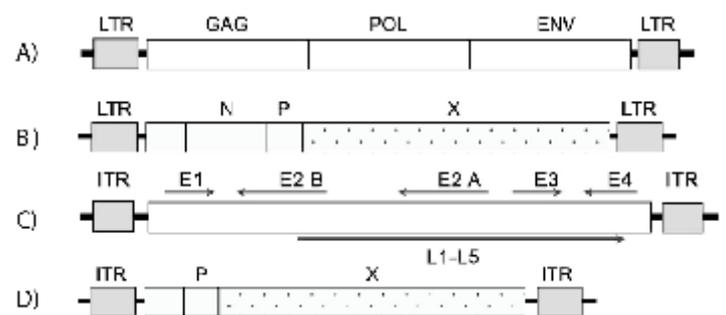
porción de un ácido nucleico externo, denominado transgen. Como el vector debe multiplicar y salir de la célula “blanco” o el tejido que infecta, es necesario que incluya secuencias de regulación, tales como una señal de replicación y otra de encapsidación. Pero, dado que se construyen deficientes en la replicación respecto del virus salvaje, los genes necesarios para replicar se proveen por separado a través de plásmidos, un virus auxiliar, o bien por líneas celulares de empaquetamiento. En particular, para los virus grandes como vaccinia o baculovirus que no pueden cortarse y armarse *in vitro* con facilidad, se utilizan construcciones donde el transgen está flanqueado por secuencias no esenciales del virus. En la célula, la presencia de un plásmido así construido junto con el ADN genómico viral, que se provee por transfección o por infección con el virus entero, permite una recombinación que forma un virus recombinante que se llama vector (1).

Los VVs más utilizados en los laboratorios de investigación básica son los retrovirus, los adenovirus, los virus asociados a adenovirus, los virus herpes simplex, los alfavirus y los baculovirus. Cada grupo de VVs presenta determinadas ventajas y desventajas que los hace apropiados para distintos tipos de aplicaciones (2). Así, los virus pequeños, como retrovirus o lentivirus, cuyos ARN se retrotranscriben a ADN, se importan al núcleo, se integran a los cromosomas de la célula huésped y, por lo tanto, tienen una expresión estable o permanente en el tiempo. Los vectores retrovirales más usados en la transferencia de material genético son los retrovirus murino y aviar. Los virus salvajes consisten en dos copias de genoma de ARN poliadenilado empaquetado en un core, que a su vez es encapsidado en una cubierta de proteína de muchas unidades. El genoma tiene tres áreas, gag (antígeno de grupo, proteína de la cápside y matriz), pol (ADN polimerasa dependiente de ADN) y env, que codifica la glicoproteína de envoltura y a su vez determina el rango de huésped (3). Se denominan virus ecotrópicos aquellos que infectan sólo las células de origen murino u otras especies de roedores, mientras los virus anfotrópicos infectan células humanas. En la Figura 1 se presentan los genomas de los retrovirus y adenovirus, de los que derivan los vectores que se consideran más usados en células y tejidos eucariotas (4).

Si bien las ventajas de los vectores retrovirales se relacionan con la eficiencia de la transferencia y la

integración, las desventajas son importantes: requiere que las células estén dividiéndose, produce bajos títulos (menos de  $10^7$  unidades transductoras por mL), el tamaño del inserto se limita a aproximadamente 8 kbp y dado que la ubicación del inserto sería al azar, produce mutaciones en el gen normal (5). En cambio, si se usan virus grandes como herpesvirus, poxvirus o adenovirus, con un genoma a ADN que no se integra, la expresión de las proteínas deseadas será transiente y el tamaño del inserto más grande; en el caso del virus de herpes simplex (HSV) puede llegar a 40 kbp. Sin embargo, también tiene una importante limitación, ya que por su especificidad por células del sistema nervioso, expresa un cierto potencial citotóxico. En el caso de los adenovirus, de importancia clínica por producir infecciones respiratorias y conjuntivales, si bien no se integran al material genético celular, poseen algunas proteínas altamente tóxicas para la célula (6). Además, como algunas proteínas favorecen una intensa respuesta inmune contra la célula infectada, los vectores adenovirales de nueva generación carecen de dichos genes inmunogénicos (2). Actualmente se ha propuesto el uso de VVs derivados tanto de adenovirus como de vaccinia, en la producción de vacunas para una futura epidemia pandémica de Influenza (7).

>> Figura 1. Genomas de Retrovirus y Adenovirus salvajes y ejemplos de sus respectivos vectores.



A-Genoma de retrovirus salvaje: la región gag codifica por la proteína de la cápside; pol da una transcriptasa reversa, una proteína integradora y una proteasa; env codifica por la glicoproteína de envoltura. Las zonas LTR, repeticiones terminales largas, participan en la regulación del ciclo viral. El tamaño del ARN genómico varía entre 8,7 (MoMLV) y 9,8 kbp (HIV). B-Genoma de un vector retroviral: Se remueven gag, pol y env. Se agregan N: resistencia a Neomicina, P, promotor y el gen X de interés. C- Genoma de adenovirus salvaje: las regiones denominadas E codifican por ARN mensajeros tempranos y las L por mensajeros tardíos, expresados durante el tiempo de replicación. Las terminaciones ITR son terminaciones repetidas invertidas que participan en la síntesis de ADN. El tamaño del genoma es de 36 kbp. D-Genoma de un vector adenoviral: Se remueven los genes virales E y se agrega P: promotor y el gen X de interés.



# PORQUE UN DIAGNÓSTICO PRECISO NECESITA RESULTADOS CONFIABLES.

Nuestro laboratorio integral está al servicio del profesional, brindando resultados confiables y asesoramiento en su interpretación, facilitando información precisa para colaborar en el diagnóstico, seguimiento y prevención de las enfermedades.

Nuestro compromiso: brindar un servicio personalizado a través de un equipo de especialistas, cumplir con los más exigentes estándares de calidad, y garantizar confiabilidad y exactitud en los resultados.

- / Biología Molecular
- / Hematología y Hemostasia
- / Microbiología
- / Endocrinología
- / Citometría de Flujo
- / Inmunoserología
- / Química Clínica
- / Virología



Consultar alcance en  
[www.oaa.org.ar](http://www.oaa.org.ar)



**STAMBOULIAN**  
LABORATORIO

**PLANTA DE LABORATORIO**  
Av. Scalabrini Ortiz 676

**DPTO. COMERCIAL**  
4858-7061 al 63  
[laboratorio@stamboulian.com.ar](mailto:laboratorio@stamboulian.com.ar)

**Centro de Atención Telefónica**  
2206-6000

[www.stamboulian.com.ar](http://www.stamboulian.com.ar)

**STAMBOULIAN**  
SERVICIOS DE SALUD

Los transgenes, el contexto genético del huésped y su relación con la bioseguridad

Es conocido que el potencial peligro de un producto génico depende de la función del gen insertado en una determinada célula u organismo. Dicho inserto puede ser idéntico a la otra copia que ya está presente en el organismo o puede ser un alelo mutante que influya en la fisiología celular si su función es dominante. Los efectos pueden ser inesperados si se inserta más de un gen, especialmente si se usa una alta multiplicidad de infección. Además, es esencial tener en cuenta aquellos genes que puedan interferir o modular la respuesta inmune celular, como son las citoquinas, los receptores de quimoquinas o los factores de crecimiento (4).

Un ejemplo histórico de los problemas que han presentado los VVs se encuentra en el adenovirus, con un genoma a ADN (36 kbp) encapsidado en una cápside icosaédrica, de aproximadamente 70 nm. En general, para sintetizar los vectores de los virus con genomas complejos, se eliminan la mayor cantidad de secuencias de codificación posible, con el fin de limitar la expresión de genes virales en células transducidas. (Figura 1) La primera generación de vectores construidos carecía de los genes tempranos denominados E1A, E1B y E3, donde los dos primeros tienen potencial oncogénico, al participar de una eficiente activación de la transcripción del ADN. En una segunda construcción se eliminó E3 para poder incluir grandes transgenes y permitir un tamaño adecuado de genoma que pudiera ser encapsidado, pero el producto resultó ser más inmunogénico que cuando se dejaba intacto E3. La respuesta inmune puede eliminar la expresión del transgen a través del reconocimiento y remoción de la célula infectada. Además, si la respuesta inmune es lo suficientemente fuerte se impide la transducción, en el caso que se repita la infección con el vector. Otras construcciones produjeron mutantes de delección en todos los genes nombrados, de manera que los vectores resultaron defectivos; sin embargo, la combinación de un par de estos vectores se puede usar como estrategia en ensayos de terapia génica (8).

En la Tabla I se muestran los huéspedes, distintos genes y las funciones celulares que afectan directamente la bioseguridad en el laboratorio. Aunque los niveles de contención se basan en el grupo de riesgo del virus

parental, los procedimientos con VVs se hacen generalmente a partir de un laboratorio BSL2, para proteger los operadores y el medio ambiente. Otros vectores basados en los virus Herpes que no son líticos y los virus de Semliki Forest Virus y virus Sindbis, con un amplio rango de huéspedes, tienen los mismos niveles de bioseguridad que los vectores de adenovirus que se incluyen en la tabla (9).

El término bioseguridad incluye diversos principios de contención, diseño, prácticas y procedimientos para impedir infecciones ocupacionales en el ambiente biomédico o la liberación de los microorganismos al exterior (10). La protección del personal que trabaja en el laboratorio, el medio ambiente, el producto y los agentes biológicos, se obtiene a través de una gestión que comprende medidas de bioseguridad y de biocustodia (11). El primer paso en el manejo del riesgo asociado a las actividades con agentes biológicos es la identificación de los peligros que son relevantes, y deben ser evaluados de acuerdo con el daño potencial que pueden causar tanto a los humanos como al medio ambiente. Una vez que el organismo modificado genéticamente (GMO) está clasificado en un dado grupo de riesgo, en base a esquemas de clasificación nacional o internacional, se analizan las discrepancias con respecto a la situación y a las regulaciones locales (8). En el análisis de riesgo de una actividad con VVs, hay que tener en cuenta las características de los mismos que influyen en las condiciones de trabajo para mantener el riesgo en un rango de aceptabilidad. Dichas propiedades son:

- 1) El tropismo del VV, se refiere a la posibilidad que el mismo pueda infectar células humanas y posteriormente expresar una propiedad deletérea. Lo óptimo es que tenga un estrecho rango de huéspedes. Por ejemplo, si se quiere usar un vector para infectar las células humanas, debería diseñarse de manera que sólo infecte dicho tejido y no otro. Se ha descrito, sin embargo, una entrada inespecífica de partículas lentivirales, en células que no expresan los receptores conocidos y que luego son inactivadas en endolisosomas, aunque es posible que la carga antigénica pueda persistir (12).
- 2) Replicación viral: aun cuando los VVs sean deficientes en su replicación pueden recuperar los genes suprimidos y convertirse en competentes para la

replicación (denominado RCV) a través de un proceso de recombinación que los lleva a adquirir las características patogénicas asociadas al virus salvaje. En particular, los vectores adenorivales, que pueden recombinar con un virus salvaje que preexista en la célula, tienen una tasa relativamente alta de RCV comparado con otros vectores. Para los VAVs los RCV ocurren solo si el genoma salvaje preexistente contiene E1. Si bien los VAVs no necesitan ser recombinantes para causar un daño en la córnea o conjuntiva (6), es conveniente usar estrategias que disminuyan las posibilidades de formar recombinantes como (a) dividir los genomas de los genes de replicación viral, (b) retirar las regiones reguladoras virales y (c) producir el vector en un solo lote. Este último protocolo puede requerir la transfección simultánea de plásmidos o bien el uso de una línea celular de empaquetamiento con genes de replicación integrados al genoma de la línea celular (13-15). En los documentos para el registro de investigaciones con ADN sintético, es conveniente solicitar en la identificación del sistema huéspedvector, tanto la línea celular del huésped como las células de

empaquetamiento que se usan para la propagación del vector recombinante. También se debe declarar el porcentaje del genoma viral remanente, si el vector es competente para la replicación o si requiere un virus *helper* (16).

3) El tipo de transgen insertado: las condiciones de trabajo se hacen mucho más estrictas si los genes se logran expresar en tejidos o en organismos en los que normalmente no se expresan, o bien si el transgen es un gen regulatorio o un oncogen. Debe recordarse que no todos los vectores derivados de un mismo virus salvaje son iguales desde el punto de vista de la bioseguridad: el tipo de inserto cambia el nivel de contención y el uso de un vector obtenido comercialmente no asegura que se pueda trabajar en un laboratorio BSL-1 (Tabla I).

4) La vía de transmisión: en la Tabla II se presentan como ejemplos de discusión sólo dos grupos de riesgo (GR1 y GR2), asociados a la posibilidad de dar o no una infección en humanos o animales, así como distintas

MicroScan



## Microbiología Automatizada

### Identificación y Sensibilidad

MicroScan responde a las necesidades de atención eficaz de los pacientes mediante resultados automatizados rápidos de ID/AST sin reducir la exactitud.



Walkway 45 Plus



Walkway 95 Plus

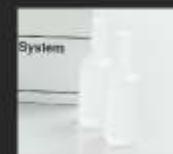


zetroSCAN



#### Selección de colonias con PROMPT

Estandarización de inóculos sin pérdida de tiempo por turbidez gracias al sistema de inoculación PROMPT™



#### Preparación de inóculos con PROMPT

La estabilidad del inóculo de hasta cuatro horas flexibiliza el flujo de trabajo.



#### Inoculación de panel con REMOK

La inoculación simultánea de los 96 pozos del panel simplifica el flujo de trabajo.

### Sistemas MicroScan

La línea se completa con múltiples opciones de paneles que han sido adaptados a la epidemiología local, de tipo Combo (ID/AST), solo CIM y solo identificación. También Paneles para identificación de levaduras, anaerobios y fastidiosos y Paneles especiales para sensibilidad de Microorganismos exigentes.

### LabPro Software Suite

La mejora de la gestión de datos con el conjunto de aplicaciones de LabPro promueve la eficacia en el laboratorio al agilizar el flujo de trabajo y facilitar el acceso a la información del paciente. LabPro Manager, LabPro Alert y LabPro Connect en forma conjunta, le ayudan a estandarizar y consolidar los pruebas, adaptar la creación visual de informes de resultados y aumentar su capacidad para identificar la emergencia de nuevas resistencias.



Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel/Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

formas de transmisión y estabilidad. En el caso de los virus salvajes y sus derivados es conocido que la dinámica de las infecciones accidentales está dominada por aerosoles infectivos a través de las membranas de las mucosas (ojos, nariz-boca) (17) y, en menor grado por infecciones percutáneas, aunque hay un número considerable de infecciones por rutas inesperadas (18). En el caso de los VAVs es conocido que la infección ocurre por transmisión oral-fecal o también por exposición a aerosoles. Si el vector adenoviral fuera defectivo en su replicación, la infección podría ser transiente y las células infectadas serían degradadas por el sistema inmune (4).

>> Tabla I. Niveles de contención para distintos vectores virales, según el huésped y el tipo de inserto

Vector basado en <sup>a</sup>	Rango de Huésped <sup>b</sup>	Inserto o función del gen <sup>d</sup>	Nivel de contención
Virus envuelto, ARN sc <sup>e</sup> : MoMLV sin gag, pol, env	Ecotrópico	S,E,M,G,CC,T MP,DR,R,TX,Ov,Oc	BSL-1
	Anfotrópico Pseudotipo VSV-G	S,E,M,T,MP,DR	BSL-2
		Ov,Oc,R,G,CC TX	BSL-2+/BSL-3 BSL-3
Lentivirus sin gag,pol,env, nef, vpr	Eco y anfotrópico, Pseudotipo VSV-G	S,E,M,MP,DR	BSL2+/ BSL-3 <sup>c</sup>
		Ov,Oc,R,CC,G,T	
		TX	BSL-3.
Virus desnudo, ADN dc <sup>f</sup> Adenovirus serotipo 2,5,7 Sin E1 y E3 o E4	Amplio rango	S,E,M,T,MP,DR	BSL-2
		Ov,Oc R,G,CC	BSL-2+
		TX	BSL-3

a) se refiere al virus parental o salvaje; b) habilidad del vector para infectar células de un determinado rango de especies. Los términos anfotrópico y pseudotipo indican infección en células humanas; c) hasta que sea apropiado un nivel BSL2/BSL2+; d) Genes celulares y funciones: S: proteínas estructurales (ej. actina); E: enzimas (proteasas, oxidasas, etc); M: enzimas del metabolismo de aminoácidos, ácidos nucleicos, etc; G: crecimiento celular; CC: ciclo celular; DR: replicación del ADN, mitosis, meiosis; MP: proteínas de membrana, canales iónicos, receptores proteicos, transportadores; T: genes reporteros como luciferasa, fotoreactivos, etc; TX: subunidad de genes activos para toxinas; R: genes regulatorios, activadores como citoquinas, linfoquinas, genes supresores, etc; Ov, Oc: oncogenes identificados por el potencial transformante de análogos celulares, virales o mutante supresoras que inhiben el gen salvaje. La proteína resultante modifica una célula normal. e) simple cadena f) doble cadena

5) Tipo de VVs: Desde el punto de vista de la bioseguridad se ha planteado una diferencia crucial entre los VAVs y los lentivirales (LVs), ya que los primeros tienen una expresión transiente y los segundos una expresión estable en el tiempo. Sin embargo, en el caso de VAV una alta multiplicidad de infección y la presencia de la replicasa viral puede llevar a la integración, mientras que para los LV existe en la actualidad una plataforma comercial

especialmente diseñada para una expresión transiente. Las construcciones de virus por transfección de varios plásmidos y la sustitución de las señales de control transcripcional, minimizan los eventos de recombinación que pueden llevar a un virus patogénico (9). Estas estrategias entonces amplían las aplicaciones de los tradicionales sistemas retrovirales basados en el virus de Leucemia Murina de Moloney (Mo MLV), ya que se pueden insertar muy eficientemente los genes de interés tanto para una célula en cultivo como *in-vivo*. En la práctica se han diseñado vectores derivados del herpesvirus tipo 1 que son especialmente letales para determinados tipos celulares que se quieran eliminar (19).

Tabla II. Asociación de los grupos de riesgo, con la transmisión, estabilidad y persistencia de los vectores virales.

Vector	GR <sup>a</sup>	Transmisión	Estabilidad	Huésped
Adenoviral	1	Contacto directo, oral-fecal, aerosoles	Estable, persiste en agua, resiste la deshidratación	Humanos, hámsters, rata de algodón
Retroviral	2	Contacto con piel dañada, inoculación parenteral, aerosol en membranas	Inactivación rápida, sensible a la deshidratación	Depende del vector
V. Vaccinia modificado	1	Ingestión, aerosol en membranas, inoculación parenteral, abrasión	Muy estable, resistencia al secado y al aumento de T <sup>a</sup>	Amplio rango
Adeno-asociado	1	Ingestión, inhalación de aerosoles, contacto con mucosa	Alta estabilidad	Humanos
Avipoxviral	1	Ingestión, aerosoles en mucosa, abrasión, inoculación parenteral	Muy estable, resistencia al secado y al aumento de T <sup>a</sup>	Pájaros
Lentiviral	2	Aerosoles en mucosa, contacto con piel dañada, inoculación parenteral	Inactivación rápida.	Humanos
Herpesviral (HSV-1)	1	Contacto directo, inhalación de aerosoles	Inactivación rápida, sensible a la deshidratación	Humanos

a) GR: grupo de riesgo del vector sin considerar los transgenes. Esta clasificación pertenece exclusivamente a Bélgica (24). GR1 no causa enfermedad al hombre o animales. GR2 puede causar enfermedades al hombre o animales sin serio riesgo para técnicos, comunidad o medio ambiente.

Condiciones de uso de los vectores virales

Los VVs deben ser manejados por personal especialmente entrenado (8), ya que las actividades típicas como inoculación de los cultivos de tejidos, manejo de células donde se forman las partículas infecciosas, inoculación de los animales con células o partículas

- NUEVA PLANTA AUTOMATIZADA -

*Agilidad y eficiencia  
diagnóstica*

*Diagnóstico  
genético*

*Seguridad y  
trazabilidad*

*40 años  
de trayectoria*

# AVANZAMOS

Con esfuerzo, inversión permanente en tecnología y profesionales con los más altos valores humanos inauguramos nuestra nueva planta automatizada con metodología Lean en sus procesos.

Un laboratorio de vanguardia al servicio de la salud.

**Labmedicina**  
ANÁLISIS CLÍNICOS



CALIDAD ACREDITADA ISO 15189  
Alcances en [www.oaa.org.ar](http://www.oaa.org.ar)

[www.labmedicina.com](http://www.labmedicina.com)

infecciosas del vector, constituyen un riesgo para el operador, quien también puede liberar ese vector al medio ambiente e infectar a otras personas (20). Para los VAVs y VLVs que se tratan en esta revisión, se ha descrito que el nivel de exposición depende tanto de las prácticas de laboratorio que se lleven a cabo, como del número de partículas; por ejemplo, la seguridad debe aumentar si se producen partículas virales con alto título o se manipula el stock del vector. Dado que en los protocolos convencionales con VLVs pueden producirse hasta  $10^9$  unidades de transducción/mL (21) las instalaciones pueden ser BSL-1, sólo si el vector no replicara y si existieran buenas prácticas microbiológicas con accesos restringidos (22). De lo contrario, es más seguro trabajar a partir de BSL-2.

### Riesgos asociados a las características de los vectores

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) los grupos de riesgo tienen en cuenta tres parámetros: la severidad de la enfermedad que el microorganismo cause en seres humanos o animales, su habilidad para diseminarse en la población y la disponibilidad de profilaxis o un tratamiento eficiente. El agente clasificado como RG1 probablemente no cause enfermedad y en cambio, el más peligroso sería el RG4 para el cual no hay tratamiento disponible. En un análisis de riesgo, además de los tres parámetros mencionados más arriba hay que considerar también la estabilidad en el medio ambiente, que se relaciona directamente con las propiedades del virus que dio origen al vector (Tabla II). Debe recordarse que los más resistentes a la inactivación química o térmica son los virus desnudos, cuya cápside protege eficientemente al genoma viral. Con respecto al tratamiento si bien para algunos virus, como los retrovirus, existen distintos compuestos antivirales, para otros virus como los adenovirus no hay vacuna ni tratamiento antiviral disponible.

Todos estos aspectos definen el nivel de contención del laboratorio donde se debe trabajar, que se presentan en la Tabla II, donde la mayoría de ellos pueden afectar a seres humanos (23). Los grupos de riesgo de los vectores son menores que el virus salvaje, WT, siempre que la modificación en el genoma lleve a la atenuación del virus. Sin embargo, para ubicarlo bien hay que conocer no sólo las propiedades de los transgenes, como se ha

presentado en la Tabla I, sino, como ya se ha mencionado, la posibilidad que recombinen o que ocurra un rearrreglo o reasociación al ser usado en células donde ya existe un virus salvaje (1).

### Evaluación del riesgo ambiental

La liberación de GMO requiere un ensayo de riesgo en el medio ambiente (ERA) que tiene como finalidad identificar y evaluar los potenciales efectos adversos que dichos organismos puedan tener en la salud pública, el medio ambiente y también son parte de los procedimientos para la autorización de uso en el mercado comercial (4). El uso de los GMO, su preparación y conservación están descritos en las directivas europeas del año 2009 (24). En un ensayo ERA se analizan aspectos cuali y cuantitativos relacionados con la identificación y caracterización de los peligros potenciales y su probabilidad de ocurrencia, tal como se realiza en muchos sistemas legislativos (24). En la identificación de dichos peligros, el impacto y los posibles efectos adversos, se deben tener en cuenta los parámetros incluidos en las Tablas I y II (21)(18).

Algunos procedimientos pueden llevar a la exposición del operador al VV durante la preparación y producción, así como durante el descarte. Por ej., una exposición directa puede ocurrir de forma accidental a través de (i) inoculación parenteral, (ii) inhalación de gotitas o aerosoles infecciosos, (iii) ingestión oral o (iv) contacto directo con las mucosas, la piel dañada, los ojos, etc. (13)(25)(26). En el caso de los VLVs basados en VIH, el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, la ruta más probable de infección en el laboratorio es por accidentes con agujas o cortes. En este caso existe una alta posibilidad que las células que se infecten sean transformadas por integración del VLV al genoma, ya que se diseñan especialmente con este propósito (27). Se ha descrito que la generación de aerosoles por centrifugación o pipeteo de VLV, con gotitas de menos de 5 micrones de diámetro (aerosoles), pueden alcanzar más de 1 metro de distancia y penetrar a la región traqueobronquial o hasta el alvéolo, según su tamaño (17)(20).

### Medidas generales de contención

A continuación, se detallan las principales medidas

de bioseguridad, ya que la adherencia a las mismas disminuye estadísticamente los riesgos en el laboratorio (13):

1. Las operaciones que producen aerosoles deben ser minimizadas y todo el personal debe usar los equipos de protección colectivo o personal (22).
2. Uso de material plástico y eliminación de agujas (17).
3. Debe haber un plan de emergencia con procedimientos de contención en el caso de derrames y accidentes. El personal debe tener información sobre la eficacia de los distintos desinfectantes a usar y las medidas a tomar si se caen o se rompen los viales donde están almacenados los vectores (6).
4. Los materiales contaminados, usados para el transporte, o la preparación de los GMO, instrumentos, ropas y superficies, deben ser adecuadamente tratados con desinfectantes aprobados por las autoridades competentes. Asimismo, el material descartable contaminado debe ser inactivado por un método adecuado, antes de su eliminación final.
5. Si está disponible, como en el caso de los lentivirus, la profilaxis es una medida de contención y control, que debiera aplicarse antes de la preparación y uso de los vectores, cuando la probabilidad de exposición es alta. Una exposición para un lentivirus específico con el que se

trabaja en un laboratorio puede incluir el tratamiento con un compuesto antirretroviral, dentro de las 2 h de producido el incidente. También se recomienda en las guías del NIH, un seguimiento de salud a largo plazo del individuo infectado (17). En otros casos se pueden neutralizar las partículas lentivirales según cuál sea la fuente de la glicoproteína de superficie (12).

Responsabilidades, comités de bioseguridad y biocustodia

Los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de EE.UU., publicaron en 1976 las primeras Guías para la investigación con moléculas de ADN recombinantes y propusieron que un Comité Institucional de Bioseguridad (IBC) debía revisar y supervisar la investigación con dicho material. Así se establecieron los fundamentos para las revisiones de los proyectos y la vigilancia del trabajo con ADN recombinante, que incluyen aspectos tan variados como la evaluación de los niveles de contención, las instalaciones, los procedimientos y la capacitación del personal (29) (30). Es importante que el entrenamiento no se limite a una instrucción inicial sino que se compruebe periódicamente (31). En la República Argentina el CONICET aprobó el documento "Estrategia en materia de Sistemas de Gestión de Calidad, Seguridad y Bioseguridad" para el cumplimiento de la legislación vigente en la materia (32) en el que al igual que otros documentos internacionales se refiere a la necesidad de contar con un IBC, para la gestión de riesgo biológico, que actúe como un cuerpo independiente, colegiado y supervisor de los

## ZIKA, DENGUE & CHIKUNGUNYA

**KIT DE DETECCIÓN POR REAL TIME PCR DISEÑADO PARA LA DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN ESPECÍFICA DE LOS VIRUS ZIKA, DENGUE Y CHIKUNGUNYA EN MUESTRAS CLÍNICAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON SIGNOS Y SÍNTOMAS DE INFECCIÓN POR ESTOS VIRUS**

- El RNA es extraído a partir de las muestras clínicas, provenientes de sangre entera, suero, plasma u orina
- Compatible con múltiples plataformas de extracción manual y automáticas

- FTD-84-32 Test para 32 reacciones
- FTD-84-64 Test para 64 reacciones
- Validados con diferentes equipos de Real Time PCR

 **tecnolab**



**Fast Track**   
DIAGNOSTICS  
A Siemens Healthineers Company



Estomba 964 | C1427COV CABA  
Buenos Aires | Argentina  
Tel: 54 11 4859 5300  
info@tecnolab.com.ar  
[tecnolab.com.ar](http://tecnolab.com.ar)

asuntos que involucren dicho riesgo (33). Además, el IBC debe planear la capacitación en gestión de riesgo biológico según las necesidades de la organización, contar, administrativamente, con reglas de funcionamiento documentadas y reunirse con una frecuencia definida. Debe reportar al Director de la Institución y puede formar parte o interactuar con otros Comités de Seguridad e Higiene o grupos de trabajo integrados por representantes de trabajadores y de la organización.

En la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de UBA existe un Subcomité de Bioseguridad denominado SCBS que asesora al Servicio de Higiene y Seguridad en el análisis y determinación de las condiciones de trabajo de proyectos con riesgo biológico. Ya se ha indicado que la bioseguridad se refiere, entre otras cosas, a una adecuada contención que impida la liberación de los microorganismos al medio ambiente. Pero en el caso particular de los VVs, dado que la naturaleza de la secuencia insertada, el cambio de tropismo o el volumen de virus pueden determinar que se aumente el nivel de contención, es importante que el investigador principal interactúe con el SCBS, para implementar las condiciones de trabajo adecuadas (9)(17)(34).

Desde el punto de vista del manejo del bioriesgo es importante incluir aspectos de la biocustodia, como la identificación por parte de los laboratorios, de los materiales biológicos valiosos conocidos como VBM, cuyo manejo inapropiado puede constituir una amenaza para la salud pública. Por ejemplo, debe existir un procedimiento escrito para almacenar y destruir las muestras en condiciones apropiadas, así como también llevar un registro adecuado de las mismas. Asimismo, es importante evaluar las consecuencias de una liberación accidental o intencional, examinando el impacto en la salud de la población, las pérdidas económicas, el impacto en el funcionamiento de la institución o establecimiento y en el comportamiento social (33) (35). La biocustodia define algo más que una simple guarda de material patogénico y toxinas, evita el acceso de personas u organizaciones que puedan causar daño con las mismas (35). Es importante también que se protejan las muestras que tengan un valor histórico, científico, médico, comercial o epidemiológico y que la Institución sea solamente custodio temporal de un material que puede tener una importancia en el futuro. Por ese motivo también se debe documentar la transferencia

de material, de manera que se pueda hacer un seguimiento del mismo, así como su destrucción, si esto fuera necesario (36) (37). La clasificación del material biológico, natural o modificado como VBM, corresponde a los usuarios y responsables de la guarda del mismo, que entienden y conocen el valor del material; el IBC define el grado de protección requerido. En consonancia con pares de la comunidad científica, las autoridades y también los editores de revistas científicas son responsables de asegurar el correcto balance entre la protección del material biológico y la preservación del derecho a la investigación, a fin de evitar el mal uso de dicho patrimonio. Todas las condiciones de trabajo que se han mencionado son necesarias para impedir las exposiciones y proteger al personal de laboratorio, los VVs que ellos manejan y el medio ambiente.

## >>> AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las Dras. Lucía Kordich y Sandra Cordo de FCEyN, por sus oportunos comentarios para mejorar el texto y a la Dra. Susana Fink de Academia Nacional de Medicina, por su ayuda con la traducción al portugués. ■

## >>> BIBLIOGRAFIA

- Romanowski V. Genética viral. En: Carballal G, Oubiña JR, editores. *Virología Médica*. 4ª ed. CABA: Corpus; 2015. p. 63-71.
- Legorreta Herrera M, Martínez-Flores F, Hernández Sánchez F, Zentella-Dehesa A. Los vectores virales y la transgénesis. *Vertientes* 2012;15: 5-14.
- Gómez Carrillo M. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV). En: Carballal G, Oubiña JR, editores. *Virología Médica*. 4ª ed. CABA: Corpus; 2015. p. 360-6.
- Bergmans H, Logie C, Van Maanen K, Hermsen H, Meredyth M, Van Der Vlugt C. Identification of potentially hazardous human gene products in GMO risks assessment. *Environ Biosafety Res* 2008; 7:1-9.
- Schott JW, Hoffmann D, Schambach A. Retrovirus-based vectors for transient and permanent cell modification. *Curr Opin Pharmacol* 2015; 24:135-46.
- Guidelines for research involving viral vectors. 2017. University of Kentucky. USA. Disponible en: <http://ehs.uky.edu/biosafety>. Fecha de acceso: 24 de abril de 2017.
- De Vries RD, Rimmelzaan GF. Viral vector –based influenza vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2016; 12(11): 2881-2901.
- Coelho AC, Diez JG. Biological risks and laboratory – acquired infections: a reality that cannot be ignored in health biotechnology. *Front Bioeng Biotechnol* 2015; 3: 1-10.
- Kost TA, Condreay JP, Mickleson CA. Biosafety and viral gene transfer vectors. En: Fleming DO y Hunt DL editores. *Biological Safety Principles and Practices*. 4ª ed. Washington DC: ASM Press; 2006. p. 509-29.
- Nordmann BD. Issues in biosecurity and biosafety. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36 Suppl1: S66-9.
- Zaki AN. Biosafety and biosecurity measures: management of biosafety level 3 facilities. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36S: S70-4.
- Schambach A, Zychlinski D, Ehmstroem B, Baum C. Biosafety features of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2013; 24:132-42.
- Kimman TG, Smit E, Klein MR. Evidence-based Biosafety: a review of the principles

and effectiveness of Microbiological containment measures. Clin Microbiol Rev 2008; 1: 403-25.

14. Merten OW, Hebben M, Bovolenta C. Production of lentiviral vectors. Mol Ther Methods Clin Dev 2016; 3: 16017-31.
15. Cronin J, Zhang X-Y, Reiser J. Altering the tropism of Lentiviral vectors through Pseudotyping. Curr Gene Ther 2005; 5(4): 387-98.
16. Registration document for recombinant and synthetic DNA research. 2017 University of Pennsylvania. USA. Disponible en: [www.ehrs.upenn.edu/safety\\_programs/biological\\_safety](http://www.ehrs.upenn.edu/safety_programs/biological_safety). Fecha de acceso: 25 de agosto de 2017.
17. Schlingen R, Howard J, Wooley D, Thompson M, Baden LR, Yang OO et al. Risks associated with lentiviral vectors exposures and prevention strategies. J Occup Environ Med 2016; 58: 1159-66.
18. Pedrosa PB, Cardoso TA. Viral infections in workers in hospital and research laboratory settings: a comparative review of infection modes and respective biosafety aspects. Int J Infect Dis 2011; 15: 366-76.
19. Lim F, Khaliq H, Ventosa M, Baldo A. Biosafety of gene therapy vectors derived from herpes simplex virus type 1. Curr Gene Ther 2013; 13(6): 478-91.
20. Herfst S, Bohringer M, Karo B, Lawrence P, Lewis NS, Mina MJ, et al. Drivers of airborne human to human pathogen transmission. Curr Op Virol 2017; 22: 22-9.
21. Ansorge S, Henry O, Kamen A. Recent progress in lentiviral vector mass production. Biochem Eng J 2010; 42: 362-77.
22. Pauwels K, Gijssbers R, Toelen J, Schambach A, Willard-Gallo K, Verheust C, et al. State-of-art in lentiviral vectors for research use: risk assessment and biosafety recommendations. Curr Gene Ther 2009; 9: 459-74.
23. Baldo A, van der Aker E, Bergmans, HE, Lim F, Pauwels K. General considerations on the biosafety of virus-derived vectors used in gene therapy and vaccination. Curr Gene Ther 2013; 13: 385-94.
24. Directiva 2009/41/EC del Parlamento Europeo y el Consejo. Sobre el uso contenido de microorganismos genéticamente modificados (Recast) Off J 2009 May 21; L125: 0075.
25. Eberle J, Habermann J, Gurtler LG. HIV-1 infection transmitted by serum droplets

into the eye: a case report. AIDS 2000; 14: 206-7.

26. Singh K. Laboratory-Acquired Infections. Healthcare Epidemiol 2009; 49: 142-6.
27. Logan AC, Haas D, Kafri T, Kohn DB. Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. J Virol 2004; 78 (16): 8421-36.
28. Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens: Occupational Safety and Health administration 2016; Disponible en: <http://www.osha.gov/pls/oshaweb> Fecha de acceso: 12 de agosto de 2017.
29. Shipp AC, Patterson AP. The National Institutes of Health Systems for enhancing the science, safety and ethics of recombinant DNA research. Comparative Med 2003; 53(2): 159-64.
30. New guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. 2016. Disponible en <https://osp.od.nih.gov/biotechnology/nih-guidelines>. Fecha de acceso 12 de setiembre de 2017.
31. Guidelines for Biosafety laboratory competency. CDC. Suppl 2011; 60 (2): 1-6.
32. Fink S. Bioseguridad: una responsabilidad del investigador. Medicina (Bs. As) 2010; 70(3): 299-302.
33. CEN Workshop55. Guidance Document for CEN Workshop Agreement (CWA) 15793:2008. Laboratory Biorisk Management Standard 2011. Disponible en <https://www.uab.cat/doc/CWA15793>. Fecha de acceso: 20 de abril de 2017.
34. Tarantola A, Abiteboul D, Rachline A. Infection risks following accidental exposure to blood or body fluids in health care workers. A review of pathogens transmitted in published cases. Am J Infect Control 2006; 34: 367-75
35. Biorisk Management Laboratory Biosecurity guidance WHO/CDS/EPR/2006.6. [www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl.pdf](http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl.pdf)
36. Bernacchi AS, Valles EG. Desafíos para los laboratorios biomédicos en materia de biocustodia. Int J Biosafety Biosecur 2011; 1: 1-10.
37. Kozlovac J, Schmitt B. Biosafety principles and practices for the veterinary diagnostic lab. En Cunha MV, Inácio J, editores. Veterinary infection Biology: Molecular Diagnostic and High throughput Strategies. Primera Ed. New York: Humana Press; 2015. p. 31-41.

# BD Vacutainer®

## Líder en Soluciones Preanalíticas

Calidad y Bioseguridad:  
Su interés y nuestro compromiso



Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)  
o escríbanos a: [vacutainer@bd.com](mailto:vacutainer@bd.com)

