



“Una manera de hacer Europa”

Este proyecto ha sido cofinanciado por FEDER

PLIEGO DE PRESCRIPCIONES TÉCNICAS PARA LA CONTRATACION DEL SERVICIO DE REALIZACION DE EXPERIMENTOS DE BIODISTRIBUCIÓN DE LA TERAPIA GÉNICA CON VECTORES AAV9 CON ADMINISTRACIÓN TRANSENDOCÁRDICA EN UN MODELO PORCINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO (EXPEDIENTE FIBHGM PA 03/2017)

1. OBJETO DE LA CONTRATACION

El objeto del presente procedimiento es la contratación, por parte de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón (FIBHGM), del **servicio de realización de experimentos de Biodistribución de la terapia génica con vectores AAV9 con administración transendocárdica en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio (proyecto código: DTS15/0095)**, cuyo Investigador Principal es el Dr. Francisco Fernández-Avilés Díaz, del Servicio de Cardiología del Hospital Gregorio Marañón (**EXPTE. FIBHGM PA 03/2017**).

Se contratará la realización de biodistribución de la terapia génica con vectores AAV9 con administración transendocárdica en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio. Para ello, se utilizará el siguiente modelo animal:

Especie: Porcina
Raza, cepa, subcepa o línea: Large White
Sexo: hembras (n=12 máximo), machos (n=12 máximo)
Edad y/o peso: 35 Kg

La finalidad de esta adquisición en el marco del proyecto de investigación de referencia es la siguiente: establecer la dosis ideal de AAV9 en un modelo porcino extrapolable a humanos mediante vectores AAV9 que codifican la proteína verde fluorescente (eGFP), y obtener datos suficientes de biodistribución.

2. DESCRIPCION DEL SERVICIO A CONTRATAR

El objeto del contrato es la **realización de 72 experimentos de Biodistribución de la terapia génica con vectores AAV9 con administración transendocárdica en un modelo porcino de infarto agudo de miocardio**. Para el escalado de dosis, se procederá con grupos de 2 cerdos, uno macho y uno hembra, hasta obtener una eficiente transducción del corazón mediante los vectores AAV9, tanto en el caso de animales sanos como infartados. Para este propósito, el estudio se

dividirá en fases y, tal y como se indica más abajo, se analizarán los resultados entre fases para minimizar el número de animales empleados.

Número de animales por grupo: 2; máximo 12 grupos con diferentes dosis de la terapia para obtener una dosis que transluzca satisfactoriamente la zona del miocardio a tratar, minimizando el impacto en otros órganos del cuerpo (6 en el caso de animales sanos y 6 en el caso de animales infartados). Primero se procederá con los animales sanos y se iniciará el estudio con animales infartados a partir de la dosis óptima obtenida anteriormente.

En todo caso el número máximo será de (n=24) animales, es decir, se evaluarán como máximo 6 dosis distintas en cada caso. En el caso de animales infartados, se seguirá el modelo de infarto agudo de miocardio optimizado por nuestro grupo en varios trabajos de investigación.

Los procedimientos a realizar son los siguientes:

Procedimiento 1. El día 0, los animales serán anestesiados y se realizará un estudio basal mediante electrocardiograma (ECG), analítica de sangre, coronariografía y ventriculografía. Tras ello se creará un infarto agudo de miocardio mediante el protocolo descrito más abajo.

Procedimiento 2. El día 5 tras el infarto los animales serán anestesiados y se realizará una resonancia magnética (RM), se evaluará el tamaño de la escara asociada al infarto, en caso de tener un tamaño menor del 15% se descartará el animal.

Procedimiento 3. Después de 7 días, los animales serán anestesiados de nuevo y se realizará un ECG, una analítica de sangre, coronariografía y ventriculografía. Tras dichos procedimientos se realizará administración con AAV9, tal y como se describe más abajo.

Procedimiento 4. A los 14 días del procedimiento 1, los animales se estudiarán de nuevo con el mismo protocolo de ECG, analítica y técnicas de imagen (coronariografía, ventriculografía, etc.), y serán sacrificados para estudios anatomopatológicos e histológicos (descritos más abajo).

Nº del Procedimiento	Título	Especie animal	Nº (max)	Grado de Severidad *
1	Generación del infarto de miocardio	Porcino	12	M
2	Resonancia Magnética	Porcino	12	L
3	Administración AAV9	Porcino	24	M
4	Estudio final	Porcino	24	SR

*Sin Recuperación (SR), Leve (L), Moderado (M) ó Severo (S)

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DEL SERVICIO

Las actividades requeridas para la realización del servicio a contratar serán las siguientes:

Protocolo de creación de infarto (dentro del Procedimiento 1):

Para los animales con creación de infarto, una vez colocado el animal en decúbito dorsal, con extensión craneal y caudal de las extremidades se debe proceder al rasurado y lavado quirúrgico de la zona infra-umbilical e inguinal, tras lo cual se establece un acceso vascular a una arteria femoral (derecha o izquierda indistintamente) mediante la técnica de Seldinger o equivalente, utilizando una vaina introductora de 6 Fr. Heparinización sistémica (150UI/kg). Previo al cateterismo cardíaco se estimarán los parámetros de función ventricular mediante la realización de

ventriculografía, para lo cual, bajo guía fluoroscópica, se introduce un catéter pig-tail en el ventrículo izquierdo y se realiza la inyección. Tras ello se intercambia por un catéter guía sobre guía hidrofílica de 0.038" a través de la vaina femoral, avanzándolo hasta introducirlo de forma selectiva en el ostium de la arteria coronaria izquierda, realizándose una coronariografía mediante la inyección manual de medio de contraste diluido al 50% (Urografin 76% o similar) en proyección OAI-30° y OAD-25°. Mediante la utilización de una guía centimetrada se medirá el diámetro de la arteria en su tercio medio. De forma coaxial se avanza un catéter balón de dilatación de 2-3 mm de diámetro (en función del diámetro de la zona diana) y 10 mm de longitud sobre guía de 0.014", situándolo distal al origen de la primera rama diagonal. Mediante la insuflación de este balón coaxial se interrumpirá el flujo coronario epicárdico desde el punto donde se encuentre situado. La expansión del balón de angioplastia se realiza a 4 atm con mantenimiento de la interrupción del flujo vascular durante 150 minutos. Transcurrido este tiempo se desinflará y retirará el balón y se comprobará la permeabilidad del vaso mediante la inyección manual de medio de contraste diluido al 50% a través del catéter guía. Seguidamente se retirará la vaina femoral, realizándose la hemostasia del punto de punción arterial mediante compresión manual.

Se deben mantener los animales monitorizados bajo anestesia general durante 60 minutos tras la inducción del infarto, con el objetivo de tratar las posibles arritmias, para lo que se dispondrá, además del posible manejo farmacológico, de un desfibrilador externo.

Medicación postoperatoria:

- Ceftiofur Clorhidrato o similar 3 mg / kg PV / IM, durante 5 días.
- Parche transdérmicos de Fentanilo o similar. Cada parche libera 25 µg / h de Fentanilo o similar.
- Buprenorfina o similar: 1 ampolla IM a las 20.00h del día de la cirugía y repetir a las 8.00h del día siguiente.

Se administrará antibioterapia profiláctica, la que se continuará durante la semana posterior a la creación del modelo.

Protocolo de resonancia magnética (RM) cardiaca con realce tardío (procedimiento 2)

Bajo anestesia general según el protocolo anteriormente descrito, se realizarán dos estudios de RM, en los que se incluirá la adquisición de imágenes de realce tardío, adquiriéndose las siguientes secuencias:

1. Secuencias en modo cine con estado estacionario de precesión libre para analizar la función ventricular (SENSE x 2, TR 2.4 ms, TE 1.2 ms, resolución espacial de 1.6 x 2 mm, 30 fases por ciclo, grosor de corte de 8 mm sin espaciado).
2. Realce tardío de la escara miocárdica (secuencia 3D de eco de gradiente potenciado en T1, inversión-recuperación; retraso del pulso optimizado para la máxima supresión de la señal miocárdica mediante secuencia looklocker o similar; TR 3.4 ms, TE 1.3 ms, resolución espacial 1.4 x 1.7 mm, grosor de corte de 5 mm, tiempo de inversión 200-300 ms).

Tanto las imágenes en modo cine como el realce tardío se obtendrán en los mismos planos: eje corto de VI (10-14 cortes consecutivos, cubriendo ambos ventrículos desde las válvulas auriculo-ventriculares hasta el apex) 4 cámaras, 2 cámaras. Las imágenes de realce tardío se obtendrán 6-10' tras la administración de 0.2 mmol/kg de gadobutrol o similar.

Protocolo de administración de tratamiento (AAV9. Procedimiento 3)

Bajo anestesia general, los animales se transportarán al quirófano. Se monitorizará la presión arterial de forma invasiva a través de una arteria femoral. Se mantendrá estable la tensión arterial mediante perfusión de suero Ringer Lactato o similar.

Se utilizarán catéteres específicos para realizar un mapeo electromecánico del ventrículo izquierdo. Tras su obtención, el catéter se sustituirá por el catéter de inyección. Se calibrará la extensión de la aguja de inyección a 0° y a 90° para obtener un ratio aguja: grosor de miocardio de 0.4. Cada jeringa conteniendo el producto terapéutico se agitará para asegurar la homogeneidad del producto. El catéter se purgará con 0.1 cc del producto a inyectar antes del procedimiento. Se cruzará la válvula aórtica con el catéter de inyección y se colocará en la región delimitada de interés (bordeando el área del infarto). Antes de cada inyección se comprobarán los siguientes parámetros: 1) posición del catéter perpendicular a la pared del ventrículo izquierdo; 2) estabilidad del catéter óptima (< 4 mm); 3) voltaje unipolar > 6.0 mV; y 4) presencia de un extrasístole ventricular al introducir la aguja en el miocardio. Dicha aguja profundizará en el miocardio 3-5 mm, y la inyección se realizará mediante entre 10 y 30 inyecciones de hasta 0.2 cc cada una, hasta un volumen máximo de administración de 3 cc. En lo que respecta a la dosis de AAV9 se trabajará en un rango entre 10^{10} y 2×10^{13} vg (viral genomes) disueltas en buffer fosfato salino PBS.

Finalmente el catéter y el introductor serán retirados y la arteria comprimida de forma manual, y el animal recuperado hasta el día del seguimiento. Todo el procedimiento deberá realizarse con el equipo de protección descrito más abajo. En caso de exposición directa al producto proceder a la descontaminación (descrita más abajo).

El cuidado y seguimiento de los animales incluirá una exploración física diaria. Se vigilarán las heridas quirúrgicas para detectar inflamación o infección. Se anotará el consumo de alimentos y la producción urinaria y fecal de los animales. Se bañará a los animales si es necesario. Se seguirán todas las indicaciones necesarias por el protocolo de punto final descrito en la presente memoria. Todos los eventos observados durante el seguimiento y las medicaciones administradas se anotarán en la historia clínica de cada cerdo.

Los animales serán alojados en un área de Bioseguridad Animal de Nivel 1. Todas las fungibles y los residuos serán tratados como de riesgo biológico. Se indicará en los cubículos el nivel de bioseguridad y de peligro, así como los nombres del personal responsable de dichos animales. Se indicará además la necesidad de utilizar patucos, guantes y batas desechables.

Método de Eutanasia (dentro del Procedimiento 4)

A la finalización del procedimiento 2, se procederá al sacrificio de los animales por método físico, siempre bajo anestesia general, siguiendo las recomendaciones del American Veterinary Medical Association Panel on Eutanasia.

Inmediatamente se procederá a la realización de un estudio de necropsia y extracción del corazón para su procesamiento histológico. Se pesará el corazón y, en los casos con infarto, se documentará la localización y tamaño del infarto. Se tomarán imágenes de las lesiones identificadas y se anotarán en un esquema dichas alteraciones.

Para el análisis de biodistribución, se tomarán 6 biopsias de cada una de las siguientes zonas. Cinco de las muestras se introducirán en nitrógeno líquido para posterior almacenamiento a -80°C hasta su procesamiento y la restante en formaldehído al 4%.

- Muestras cardíacas: se realizará un muestreo exhaustivo del miocardio para analizar la difusión del producto terapéutico, que podrá alcanzar un máximo de 100 puntos además de la arteria aorta y vena cava.

- Otras zonas para evaluación de la biodistribución: Médula ósea, piel, tejido adiposo subcutáneo, bazo, riñones (izquierdo y derecho), tejido adiposo perirrenal, glándula suprarrenal (izquierda y derecha), hígado (lóbulo lateral izquierdo, lóbulo medial izquierdo, lóbulo medial derecho), pulmones (izquierdo y derecho), linfonodos mandibulares (derecho e izquierdo), linfonodos poplíteos (derecho e izquierdo), timo, intestino delgado, páncreas (lóbulo esplénico, lóbulo duodenal, lóbulo conector y puente), ganglio trigémico, linfonodo retrofaringeo derecho, vejiga, cerebro (corteza, hipotálamo), nervio ciático, ojo, musculo esquelético (pierna); en caso de machos testículos (izquierdo y derecho) y epidídimo (izquierdo y derecho) y en caso de hembras ovarios (izquierdo y derecho).

Los animales deben ser recibidos por el proveedor de servicios y serán reconocidos, identificados y sometidos al programa sanitario habitual tras la llegada. Serán alojados en cubículos de dimensiones adecuadas en función de su tamaño y en grupos, si es posible. Serán alimentados con dieta de mantenimiento racionada y agua a disposición.

Tras el procedimiento 3, una vez los animales han sido inoculados con el vector AAV9, los animales serán alojados en un área de Bioseguridad Animal de Nivel 1. Todos los fungibles, residuos y establos serán tratados tal y como se indica más abajo.

Se indicará en los cubículos el nivel de bioseguridad y de peligro, así como los nombres del personal responsable de dichos animales. Se indicará además la necesidad de utilizar el equipamiento de protección individual descrito más abajo.

3. OBJETIVO Y RESULTADOS ESPERADOS

El objetivo primario de este estudio es determinar la seguridad y factibilidad de este tratamiento. Así, las variables de seguridad y factibilidad serán:

1. Complicaciones relacionadas con la inyección transendocárdica (arritmias ventriculares, perforación ventricular, desarrollo de isquemia miocárdica). (Variables dicotómicas).
2. Estudio anatomopatológico (inflamación, formación de tejidos anormales, tanto macro como microscópicamente). (Variables dicotómicas).
3. Análisis de laboratorio (marcadores de daño hepático como AST, ALT; hemograma, proteína C reactiva, marcadores de daño miocárdico como CPK, CPK-MB y TnT, glucosa, bilirrubina total, GOT, GPT, urea y creatinina). (Variables continuas).
4. Tamaño de la escara producida por el infarto mediante RM (Variable continua, sólo animales con infarto).

Dentro de los análisis de eficacia del tratamiento de biodistribución se evaluará la eficacia de transducción en los diferentes tejidos mediante inmunodetección del GFP, evaluación del número de copias génicas del vector y expresión del GFP mediante análisis mRNA.

Se detendrá el estudio de dosis al lograr en una transducción superior al 70% de los cardiomiocitos en la zona tratada y a la vez una transducción inferior al 5% en cerebro, hígado y pulmones. Este criterio se tomará tanto para los animales sanos como para los de infarto.

Para ello se evaluarán las distintas dosis en grupos de dos animales, para asegurar la reproducibilidad tal y como se acostumbra en la bibliografía. Para evitar sesgos de sexo se empleará un macho y una hembra para cada dosis. El estudio se dividirá en fases de 2 dosis (i.e. 4 animales por fase), se analizarán los resultados y se aumentará o disminuirá la dosis en función de

éstos convergiendo a la dosis óptima. Se procederá en primer lugar con los animales sanos y se iniciará el estudio con animales infartados a partir de la dosis obtenida en animales sanos.

Las dos primeras dosis propuestas son 10^{11} y 10^{12} viral genomas que se administrarán en 10 inyecciones alrededor del infarto, esto se basa en la experiencia previa de equipos colaboradores del proyecto en modelo de ratón y de perro, extrapolando el volumen transducido en estos casos con respecto al del tamaño del infarto (i.e. 60 gramos).

4. ANESTESIA, ANALGESIA, TOMA DE MUESTRAS Y ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS

Los procedimientos se llevarán a cabo bajo anestesia general. Los animales serán premedicados debidamente por vía intramuscular profunda. Tras 10 minutos, la anestesia será inducida con vía intravenosa. Posteriormente, se procederá a intubar a los animales con tubos endotraqueales con neumotaponamiento de tamaño adecuado al peso del animal (nº 6.5-9.0).

El mantenimiento anestésico se llevará a cabo utilizando sevoflurano en oxígeno a una concentración de EtSEVO o similar 1,8-2%. Los animales se conectarán a un circuito circular semicerrado unido a un ventilador con un flujo de gas fresco inicial de 3 L/min; cuando se alcance el plano anestésico adecuado se instaurará un FGF de 0,5 L/min. La ventilación será controlada con un volumen tidal de 8-10 ml/kg a una tasa ajustada para obtener valores de normocapnia o similar (35-40 mmHg de CO₂).

La analgesia intraoperatoria consistirá en la administración de una asociación de medicamentos vía intravenosa al inicio de la experiencia, seguida de una infusión continua de la misma asociación (1 mg/kg/h; 2 mg/kg/h respectivamente).

Como fluidoterapia, se administrará una infusión continua de NaCl o similar 0,9 % (5-10 ml/kg/h) a través de la vena marginal de la oreja durante el mantenimiento anestésico.

Se instaurará una terapia antiarrítmica con Lidocaína o similar al 2% en infusión intravenosa continua (1 mg/kg/h), comenzando la misma tras la estabilización anestésica inicial del animal y finalizando tras una hora de reperusión post IAM. Previo a la oclusión coronaria, se administrará un bolus de 1 mg/kg de Lidocaína 2% o similar.

Una vez finalizada la experiencia los animales se recuperarán de la anestesia cortando el agente halogenado en el vaporizador e incrementando el FGF a 4-5 L/min para lavar el circuito anestésico.

Como analgesia postoperatoria recibirán buprenorfina o similar por vía intramuscular a una dosis de 10 µg/Kg/12 h durante 1 día y se colocará un parche transdérmico de fentanilo o similar de 25 µg/h.

Todos los procedimientos a llevar cabo sobre los animales se consideran moderados (inducción del modelo de infarto por vía endovascular e inyección AAV9).

Protocolo anestesia para procedimiento leve:

Los animales serán premedicados por vía intramuscular profunda. Tras 10 minutos, la anestesia será inducida con propofol o similar 1% (3 mg/kg) vía intravenosa. Posteriormente, se procederá a intubar a los animales con tubos endotraqueales con neumotaponamiento de tamaño adecuado al peso del animal (nº 6.5-9.0).

Pasarán a la sala de resonancia magnética (RM), donde el mantenimiento anestésico se llevará a cabo mediante una infusión continua de propofol o similar a una tasa de 8-12 mg/kg/h. Los animales se conectarán a un ventilador de transporte compatible con RM y se establecerá una

ventilación mecánica controlada por presión con O₂ al 100% para mantener valores de normocapnia.

Se administrará una infusión continua de NaCl o similar 0,9 % (5-10 ml/kg/h) a través de la vena marginal de la oreja durante el mantenimiento anestésico.

Como monitorización, se registrarán los siguientes parámetros hora: frecuencia cardíaca mediante ECG, frecuencia respiratoria y presión pico en vías aéreas. Una vez finalizada la experiencia, los animales se recuperarán de la anestesia mediante retirada de la infusión de propofol o similar. Se registrarán la recuperación de reflejos, así como la ventilación espontánea, primeros movimientos y tiempo de decúbito esternal.

Protocolo anestesia para procedimiento moderado:

Los cerdos se mantendrán en ayunas de sólidos desde 24 horas antes de la anestesia. Los animales serán premedicados por vía intramuscular profunda. Tras 10 minutos, la anestesia será inducida con propofol o similar 1% (3 mg/kg) vía intravenosa. Posteriormente, se procederá a intubar a los animales con tubos endotraqueales con neumotaponamiento de tamaño adecuado al peso del animal (nº 6.5-9.0).

El mantenimiento anestésico se llevará a cabo utilizando sevoflurano en oxígeno a una concentración de EtSEVO o similar 1,8-2%. Los animales se conectarán a un circuito circular semicerrado unido a un ventilador con un flujo de gas fresco inicial de 3 L/min; cuando se alcance el plano anestésico adecuado se instaurará un FGF o similar de 0,5 L/min. La ventilación será controlada con un volumen tidal de 8-10 ml/kg a una tasa ajustada para obtener valores de normocapnia (35-40 mmHg de CO₂).

La analgesia intraoperatoria consistirá en la administración de una asociación de medicamentos vía intravenosa al inicio de la experiencia, seguida de una infusión continua de la misma asociación (1 mg/kg/h; 2 mg/kg/h respectivamente).

Como fluidoterapia, se administrará una infusión continua de NaCl o similar 0,9 % (5-10 ml/kg/h) a través de la vena marginal de la oreja durante el mantenimiento anestésico.

Se instaurará una terapia antiarrítmica con Lidocaína al 2% o similar en infusión intravenosa continua (1 mg/kg/h), comenzando la misma tras la estabilización anestésica inicial del animal y finalizando tras una hora de reperfusión post IAM. Previo a la oclusión coronaria, se administrará un bolus de 1 mg/kg de Lidocaína 2% o similar.

La monitorización anestésica intraoperatoria consistirá en el registro de:

- Parámetros cardíacos y hemodinámicos: frecuencia cardíaca, electrocardiograma, pulsometría y presión arterial invasiva.
- Parámetros ventilatorios y de oxigenación: frecuencia respiratoria, oximetría, presión en vías aéreas, CO₂ inspirado y espirado, capnograma y agente inhalatorio halogenado inspirado y espirado.

Una vez finalizada la experiencia los animales se recuperarán de la anestesia cortando el agente halogenado en el vaporizador e incrementando el FGF a 4-5 L/min para lavar el circuito anestésico.

ENTREGABLES

Después de cada uno de los procedimientos se deberá entregar **un informe que describa el proceso seguido y posibles resultados y conclusiones.**

Asimismo, se elaborará un **entregable final** que recoja todas las actuaciones realizadas al finalizar los trabajos.

5. CALIDAD DE LA ENTIDAD ADJUDICATARIA

Para paliar o minimizar el sufrimiento de los animales utilizados es preciso que el proveedor de servicios seleccionado tenga experiencia acreditada en investigación, formación e innovación en el ámbito sanitario y con una dilatada experiencia en ensayos preclínicos "in vivo". Asimismo debe poseer al menos las siguientes acreditaciones:

- Certificado de Calidad de AENOR (ER-0430/2002) o similar conforme a la UNE-EN-ISO 9001:08.
- Certificado de Cumplimiento de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLI 11.04/001 MSC) para poder llevar a cabo estudios, tanto en medicina humana como veterinaria de:
 - Toxicidad in vivo.
 - Tolerancia.
 - Farmacodinamia.
 - Farmacocinética.
 - Administración de producto de ensayo y obtención de especímenes no clínicos.
 - Estudios de biocompatibilidad de productos sanitarios.

El proveedor de estos servicios debe contar con todas las instalaciones especializadas necesarias para el mantenimiento y tratamiento animal. Los animales serán inspeccionados diariamente por el equipo veterinario del centro así como por el veterinario responsable del proyecto con objeto de asegurar su correcto bienestar.

6. COMPROMISOS DEL CONTRATISTA

El contratista se compromete a la correcta y adecuada realización del servicio con la calidad necesaria y con la incorporación de todas aquellas medidas técnicas que puedan ser precisas para un servicio de esta naturaleza.

Asimismo deberá seguir los protocolos e indicaciones que se indican a continuación:

Equipos de protección individual (para Procedimientos 3 y 4):

- Ropa: se utilizará pijama quirúrgico y bata para las operaciones que requieren inoculación de vector. Siempre que se entre en la habitación donde se alojen los animales tras la inoculación, se utilizará una bata de laboratorio que cubra la ropa de calle.
- Guantes: se utilizará doble guante de látex para las inoculaciones y un solo guante para las manipulaciones de los animales.
- Mascarilla: se utilizará mascarilla quirúrgica en ambos casos.
- Calzado: el calzado de calle se protegerá con patucos de un solo uso que se eliminarán al salir de cada estancia.
- Gafas: durante la inoculación de los vectores, se utilizarán gafas de protección de plástico transparente.
- Gorro: se utilizarán gorros desechables para cubrir el cabello durante las inoculaciones de vectores.

Instrucciones descontaminación en caso de exposición AAV

Contacto directo en la piel, ojo o membrana mucosa: Enjuague un mínimo de 15 minutos en la superficie afectada. Reportar el incidente a la dirección del centro.

Exposición a través de agujas o elementos afilados: Retirar el objeto, inducir sangrado, y lavar la superficie contaminada a fondo durante varios minutos con una solución al 10% de povidona o similar y cantidades copiosas de agua. Reportar el incidente a la dirección del centro y recurrir a atención médica.

Desinfección y limpieza (para el Procedimiento 3 y 4):

Protocolo general:

Los materiales para descontaminar fuera del laboratorio se deben colocar en el recipiente duradero a prueba de fugas y garantizado para el transporte.

- Las soluciones se deben preparar semanalmente.
- Garantizar un tiempo de contacto de 15 minutos, entre la solución y el instrumental a desinfectar.
- Utilizar desinfectante para el tratamiento de material reutilizable, las superficies y en el caso de los residuos líquidos (volumen final 1% de lejía o similar).

El tratamiento en autoclave durante 1 hora a 121 ° C o 250 ° F (15 lbs psi de presión de vapor).

- Utilizar este método de desinfección para equipos reutilizables o residuos sólidos no descritos en protocolos específicos.

Protocolos específicos:

- Jeringas: Serán eliminadas inmediatamente en un contenedor de residuos biopeligrosos situado dentro de la habitación.
- Material quirúrgico: Se limpiará con virkon o similar 1%.
- Superficies de trabajo: Las superficies deben descontaminarse utilizando Virkon o similar 1%. Transcurridos 10 minutos se descontaminarán con etanol o similar 70%, dejándolo hasta su evaporación. Para la desinfección se utiliza hipoclorito sódico o similar 0.5%.
- Derrame de material biológico: Cubrir con papel absorbente y añadir hipoclorito sódico o similar 1% final en sentido circular desde la periferia hacia el centro. Dejar unos 10 min de tiempo de contacto. Recoger con pinzas los residuos y dejar en bolsa de basura para posterior autoclavado. Limpiar de nuevo la zona afectada con etanol o similar 70%. Registrar, señalizar la zona y comunicar el accidente al supervisor de la instalación.
- Cadáveres, defecaciones y micciones de los animales: Se recogerán, con material absorbente en su caso, y se depositarán en recipientes duraderos a prueba de fugas para su posterior eliminación por incineración.
- Establos: Al finalizar el protocolo los establos serán tratados con desinfectante químico, de acuerdo con los protocolos del centro.
- Líquidos: Incubación con 10% lejía o similar durante un mínimo de 20 minutos. Se debe tener especial cuidado de no autoclavar los residuos que han sido descontaminados con lejía o similar.

Requerimientos de transporte AAV**

Para los vectores, como sustancias infecciosas de categoría B, se seguirán los requisitos de la Instrucción de Embalaje P650. De este modo las sustancias deben estar debidamente etiquetados y contenidos para el transporte, siguiendo el sistema triple básico para embalaje:

El sistema consiste de tres capas:

1. El recipiente primario. Un recipiente estanco, a prueba de filtraciones, etiquetado, que contiene el espécimen. El recipiente se envuelve en material absorbente suficiente para absorber todo el fluido en caso de ruptura.
2. El recipiente secundario. Un segundo recipiente estanco, a prueba de filtraciones, que encierra y protege el (los) recipiente(s) primario(s). Se pueden colocar varios recipientes primarios envueltos en un recipiente secundario. Se debe usar suficiente material absorbente para proteger a todos los recipientes primarios y evitar los choques entre ellos.
3. Paquete externo de envío. El recipiente secundario se coloca en un paquete de envío que protege el recipiente secundario y su contenido de los elementos externos, tales como daño físico y agua, mientras se encuentra en tránsito.

Los formularios con datos del espécimen, cartas y otras informaciones que identifican o describen el espécimen y también identifican el remitente y el destinatario deben ser pegados con cinta adhesiva en el exterior del recipiente secundario.

El exterior del recipiente externo se etiquetará con la siguiente información:

- el nombre, la dirección y el número de teléfono del expedidor (remitente, consignador)
- el número de teléfono de una persona responsable e informada acerca del envío
- el nombre, la dirección y el número de teléfono del destinatario (consignatario)
- la designación oficial de transporte («BIOLOGICAL SUBSTANCE, CATEGORY B» o SUSTANCIA BIOLÓGICA, CATEGORÍA B) junto a la marca romboide mostrada en la figura.
- requisitos relativos a la temperatura de almacenamiento (opcional).

Para los envíos de sustancias infecciosas de categoría B se utilizará la marca que se muestra en la figura:



Para sustancias refrigeradas, el hielo seco se situará alrededor del embalaje secundario, el sobreembalaje deberá permitir la salida de gas carbónico, los recipientes primarios y secundarios deberán mantener sus propiedades a bajas temperaturas.

Requerimientos de transporte muestras de animales transducidos*

Las muestras, por su riesgo mínimo de contener agentes patógenos serán tratados como "Exempt animal specimen". Se seguirán las instrucciones de embalaje descritas anteriormente con embalaje de tres capas. En este caso el exterior del recipiente externo se etiquetará con la siguiente información:

- el nombre, la dirección y el número de teléfono del expedidor (remitente, consignador)

- el nombre, la dirección y el número de teléfono del destinatario (consignatario).
- la designación oficial de transporte («EXEMPT ANIMAL SPECIMENS»).
- requisitos relativos a la temperatura de almacenamiento (opcional).

*El envío de sustancias se realizará en todo caso por transporte terrestre por territorio español.

7. PLAZO DE EJECUCIÓN

La duración total de los procedimientos en un animal será de **14 días**, tiempo que transcurre entre el procedimiento 1 y el 4 (sin recuperación). En el caso de cerdos sin infarto la duración será de 7 días (tiempo entre el procedimiento 3 y 4).

Cerdos con infarto (n=12 máximo):

Inducción de infarto: día 0.

Resonancia Magnética: día 5.

Tratamiento AAV9: 7 días post-infarto.

Tiempo de Sacrificio: 14 días post-infarto (7 días post AAV9).

Cerdos sin infarto (n=12):

Tratamiento AAV9: día 0.

Tiempo de Sacrificio: 7 días post AAV9.

Siete días después del tratamiento con vectores AAV9, una vez recogidos todos los datos necesarios con el animal vivo (bajo anestesia general), se le heparinizará a dosis plenas (3mg/kg, IV) y se producirá una parada cardíaca en condiciones de anestesia profunda mediante la inducción de fibrilación ventricular con corriente continua (4.5 V) conectada a un catéter electrodo colocado en el ventrículo derecho a continuación se realizará la sección aórtica y extracción del corazón.

El plazo en que deben ejecutarse los experimentos finaliza el 31 de diciembre de 2018.

Se contempla la posibilidad de prórroga del contrato, en casos debidamente justificados, y según lo recogido en el PCAP.

8. NORMATIVA DE APLICACIÓN

Para la realización del servicio objeto de esta licitación se aplicará la normativa de referencia de índole comunitaria, estatal, autonómica y local.

Madrid, a 15 de junio de 2017

LA VICEPRESIDENTA DEL PATRONATO

Fdo: Dña. Carmen Oñate Heredero
Vicepresidenta del Patronato
Fundación para la Investigación Biomédica
Hospital Gregorio Marañón