



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

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1. Entidad responsable de la actividad

Nombre: [Instituto de Salud Global de Barcelona \(ISGlobal\)](#).

Dirección postal: [Carrer Rosselló 132, 08036 Barcelona](#).

2. Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: [Gonzalo Vicente Lacambra](#).

NIF: [25445668D](#).

Cargo: [Gerente](#).

Tel: [93.227.98.92](#)

Correo electrónico: oci@isglobal.org

3. Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: [Julio Alonso Padilla](#)

NIF: [53408936S](#)

Cargo: [Assistant Research Professor](#)

Tel: [93.227.54.00 ext.: 4284](#)

Correo electrónico: julio.a.padilla@isglobal.org

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

Nombre y apellidos: [Sandra Piquer Gibert](#)

NIF: [38098454N](#)

Cargo: [Coordinadora laboratorios IDIBAPS](#)

Tel: [\(93\) 2275400 ext.: 4388](#)

Correo electrónico: sandra.piquer@idibaps.org



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

Nombre y apellidos: [Sandra Piquer Gibert](#).

Tel: (93) 2275400 ext.: 4388

Correo electrónico: sandra.piquer@idibaps.org

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

01/2020 Rev 11

SI NO

Si la respuesta a la pregunta anterior es **SI**, debe justificarlo especificando¹:

- Nombre de la convocatoria: [Convocatoria AES_2018](#).
- Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo: “[Estudio de los procesos de inmunotrombosis y lipotoxicidad como mecanismos de patogénesis de la enfermedad de Chagas](#)”; ref.: PII8-01054; Joaquim Gascón Brustenga.
- Organismo financiador: [Instituto de Salud Carlos III](#).

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*).

Fecha de comunicación / autorización de la instalación: [18/07/2013](#).

Número de referencia del expediente: [A/ES/13/I-11](#).

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

1) Finalidad de la actividad:

[Descubrir los mecanismos de patogénesis molecular de la infección con el parásito *T. cruzi*, con particular énfasis en el rol de las fosfolipasas A2 en la síntesis de lípidos con actividad pro-agregante plaquetaria. Identificar compuestos activos que puedan ser potenciales candidatos para estudios preclínicos en animales de experimentación.](#)

2) Clasificación de la actividad:

¹TASAS

Están exentos del pago de la tasa los casos en los que se cumplan dos requisitos, que la actividad se realice en el marco de los Planes Estatales de Investigación Científica y Técnica y de Innovación; y que se desarrolle por una institución, ente u órgano público.

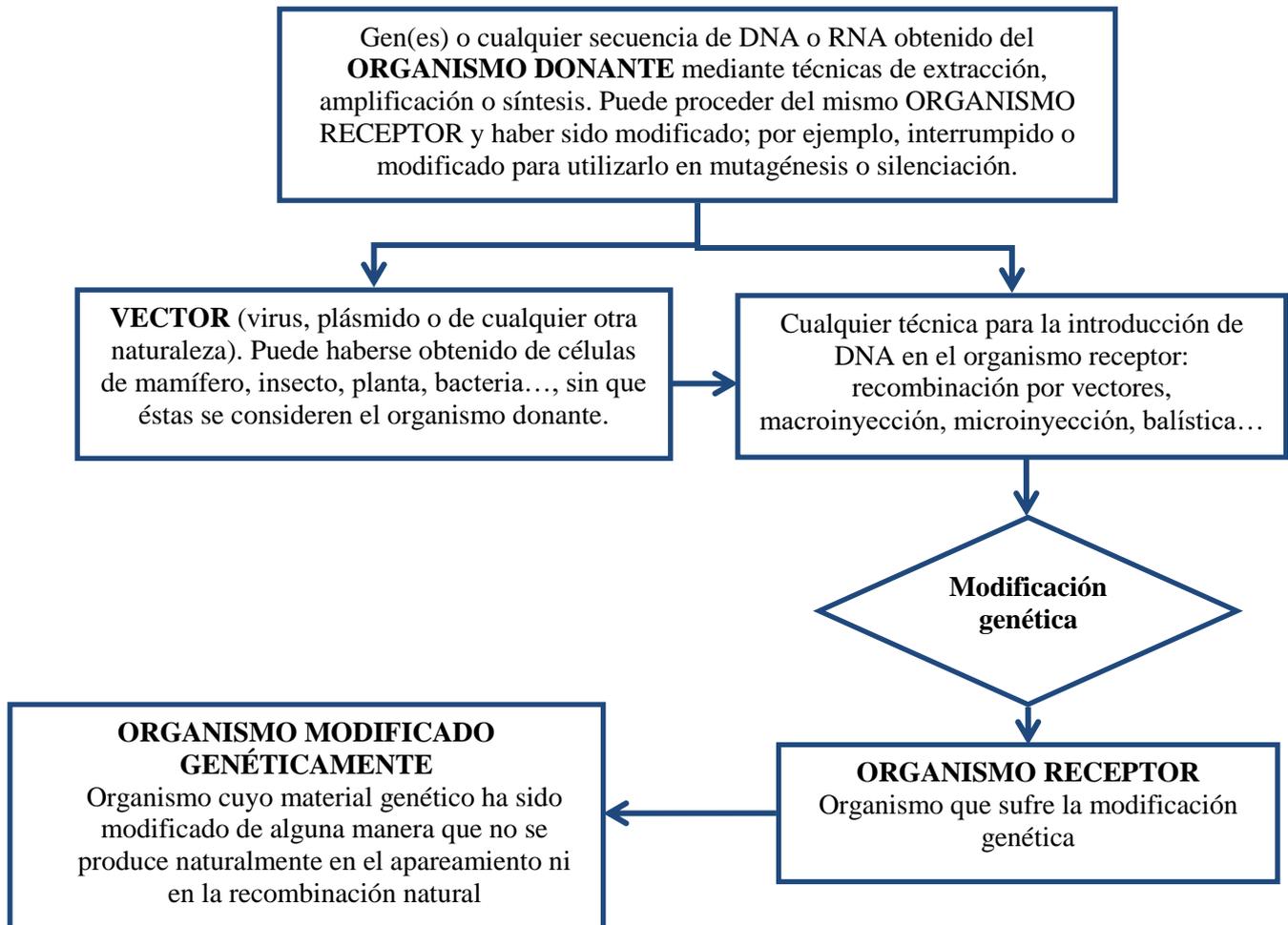


(Para la clasificación del tipo de riesgo de las operaciones se seguirá el procedimiento establecido conforme al artículo 4 y el anexo III de la Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente, y la Decisión de la Comisión 2000/608/CE, de 27 de septiembre, relativa a las Notas de orientación para la evaluación del riesgo).

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



PROCESO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE UN OMG A EFECTOS DE NOMENCLATURA:





III. INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO RECEPTOR DEL CUAL SE DERIVA EL OMG

I. Nombre científico: *Trypanosoma cruzi*.

Taxonomía:

Reino: Protista; filum: Protozoa; clase: Mastigófora; orden: Kinetoplástida; familia: Trypanosomatidae; género: Trypanosoma; especie: *T. cruzi*.

Nombre común: *T. cruzi*

1) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento:

T. cruzi se puede cultivar a partir de tejidos o muestras de sangre heparinizadas. Se utilizan diversos medios especializados, además de las líneas celulares Vero (células epiteliales de mamífero que se utilizan como hospedadoras para mantener los parásitos) u otras líneas de cultivo mamíferas que le sirvan de hospedadoras.

b) Técnicas de identificación:

Examen microscópico, inmunofluorescencia indirecta (IFA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), PCR, inmunotransferencia (Western blot).

c) Marcadores genéticos:

Marcadores de DNA microsatélite.

d) Marcadores fenotípicos:

Los trypomastigotes se presentan en formas cortas y anchas o formas largas y delgadas, en la sangre y sobrenadantes de cultivos in vitro. Los amastigotes, que se encuentran dentro de las células, son redondos u ovalados y tienen un diámetro de 1.5 a 4 μm .

e) Estabilidad genética:

Estable.

2) Posibles modificaciones genéticas anteriores: No.

3) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI NO



- 4) 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:

T. cruzi es potencialmente patógeno para seres humanos y animales mamíferos. En el caso del parásito muerto (inactivado) o sus productos extracelulares, no son considerados infecciosos.

- 5) 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.*):

La clasificación en la Unión Europea (UE) es tipo 3 (Directiva 2000/54/CE). En Estados Unidos (EE.UU.) es un agente de tipo 2 según clasificación del NIH (NIH_Appendix B-II-C, Risk Group 2 (RG2) – Parasite Agents).

- a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

T. cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Además de a humanos puede infectar a perros, ratones y otros animales mamíferos domésticos y silvestres. El parásito alterna su ciclo de vida entre un huésped vertebrado (reservorio; seres humanos y animales) y un huésped invertebrado (insecto vector; triatominos). Cabe destacar que *T. cruzi* necesita de la fase vectorial para su transmisión natural y que los insectos vectores que lo transmiten (triatominos) no se encuentran en Europa pues son endémicos de América.

La enfermedad de Chagas tiene una fase aguda y otra crónica. Si no se trata, la infección puede cronificar y durar toda la vida.

- a. La fase aguda ocurre inmediatamente después de la infección, puede durar hasta 10-12 semanas durante las que se pueden encontrar los parásitos en la sangre circulante (parasitemia). La infección puede ser leve o asintomática. Puede haber fiebre o inflamación alrededor del sitio de inoculación (lugar donde el parásito penetró la piel o la membrana mucosa). En casos poco frecuentes, la inflamación aguda puede dar lugar a una fuerte inflamación del músculo cardíaco o del cerebro y de la capa que lo recubre.
- b. Después de la fase aguda, la mayoría de personas infectadas entran en una etapa prolongada y asintomática de la enfermedad (llamada fase "crónica indeterminada), durante la cual se encuentran muy pocos o ningún parásito en la sangre. En esta etapa, la mayoría de los afectados no saben que tienen la infección. Muchas personas pueden no presentar síntomas durante toda la vida. Sin embargo, se calcula que entre un 30% y un 40% de las personas infectadas presentarán problemas médicos debilitantes y a veces potencialmente mortales a lo largo de la vida. Las complicaciones de la enfermedad de Chagas crónica pueden ser: (i) anomalías del ritmo cardíaco que pueden causar muerte repentina; (ii) dilatación del corazón, el cual no bombea bien la sangre; (iii) dilatación del esófago o del colon, que causa dificultades para comer o para evacuar. En las personas con sistemas inmunitarios deprimidos (por ejemplo, debido al SIDA o a



la quimioterapia), la enfermedad de Chagas puede reactivarse. Esta situación puede potencialmente agravar la enfermedad.

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

SI NO

Porqué: No aplica (NA), el organismo y las cepas a usar son virulentas.

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

Sí.

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

El trabajo con parásitos vivos debe ser siempre realizado en cabinas de flujo de bioseguridad. Los tubos u otros contenedores que contengan parásitos vivos no pueden abrirse fuera de la cabina. Las mucosas (nasal, bucal, conjuntiva) y la piel con heridas son potenciales sitios de infección. También existe la posibilidad de infección si el parásito es ingerido. Por lo que es necesario trabajar bajo medidas de, y en condiciones de bioseguridad. Se deben utilizar siempre guantes protectores y tubos sellados a la hora de centrifugar. Es importante evitar todos los objetos que puedan ser punzantes (vidrio o metal) en el entorno de trabajo, por lo que se utilizará solamente material de plástico en la manipulación del patógeno.

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

- a) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?:

No.

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

c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:

NA

d) Posibles nichos ecológicos:

NA.

e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

NA.

9) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

No posee.

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

No posee.

b) Interacciones con otros organismos y efectos sobre éstos:

Los parásitos infectan insectos triatominos, que son el vector de la infección. Estos insectos solo se encuentran en América y no existen en España, *T. cruzi* puede infectar una gran variedad de especies animales (mamíferos) pero precisa del vector para transmitirse de forma natural.

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

Al igual que su vector, *T. cruzi* se puede encontrar en las Américas, desde el sur de EE.UU. hasta el centro de Chile y Argentina.

11) Hábitat natural del organismo:

Infecta animales salvajes y de granja en zonas rurales de América. Infecta también insectos triatominos, que le sirven como vector para infectar huéspedes mamíferos.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

Todos los parásitos a utilizar pertenecen a la cepa CL Brener. Todas las líneas incluyen los genes: (A) **spCas9**; (B) **RNA polimerasa T7**; así como los genes de resistencia antibiótica: (C) **amino 3'-glycosyl phosphotransferase** de *Klebsiella pneumoniae*; y/o (D) **hygromycin B phosphotransferase** de *Streptomyces hygrosopicus*. Aparte de estos, algunas líneas incluyen los siguientes genes exógenos: (E) **Luciferasa** de la luciérnaga norteamericana *Photinus pyralis*; (F) **mNeonGreen** del pez lanceta *Branchiostoma lanceolatum*. Una línea posee además el gen (G) **mScarlet**, una proteína artificial derivada de la mutagénesis del molde genético de la proteína



DsRed, obtenida de la anemona marina *Discosoma striata*. Otras líneas tienen los genes de resistencia antibiótica: **(H): Blasticidin S Deaminasa** de *Aspergillus terreus* en las líneas; o **(I) Puromycin-N-acetiltransferasa** de *Streptomyces alboniger*. Todas las líneas perteneces al linaje CL Brener, ya que este es el linaje modelo de este microorganismo y el primero en ser secuenciado genómicamente (El-Sayed et al., Science 2005, 309:409-15).

A)

1) Nombre científico: *Streptococcus pyogenes*.

Taxonomía: Reino: Bacteria; filum: Firmicutes; clase: Bacilli; orden: Lactobacillales; familia: Streptococcaceae; género: *Streptococcus*; especie: *S. pyogenes*

Nombre común: *S. pyogenes*.

B)

Nombre científico: Bacteriofago T7.

Taxonomía: Heunggongvirae; filum: Uroviricota; clase: Caudoviricites; orden: Caudovirales; familia: Autographiridae; género: *Teseptimavirus*; especie: *Escherichia virus T7*.

Nombre común: Bacteriofago T7.

C)

Nombre científico: *Klebsiella pneumoniae*.

Taxonomía: Reino: Bacteria; filum: Proteobacteria; clase: Gammaproteobacteria; orden: Enterobacterales; familia: Enterobacteriaceae; género: *Klebsiella*; especie: *K. pneumoniae*.

Nombre común: *Klebsiella pneumoniae*.

D)

Nombre científico: *Streptomyces hygroscopicus*.

Taxonomía: Reino: Bacteria; filum: Actinomycetota; clase: Actinomycetia; orden: Streptomycetales; familia: Streptomycetaceae; género: *Streptomyces*; especie: *S. hygroscopicus*.

Nombre común: *S. hygroscopicus*.



E)

Nombre científico: *Photinus pyralis*.

Taxonomía: Reino: Animalia; filum: Artrópoda; clase: Insecta; orden: Coleóptera; familia: Lampiridae; género: *Photinus*; especie: *P. pyralis*.

Nombre común: Luciérnaga americana.

F)

Nombre científico: *Branchiostoma lanceolatum*.

Taxonomía: Reino: Animalia; filum: Chordata; clase: Cephalocordata; orden: Amphioxiformes; familia: Branchiostomidae; género: *Branchiostoma*; especie: *B. lanceolatum*

Nombre común: Pez lanceta.

G)

Nombre científico: *Discosoma striata*.

Taxonomía: Reino: Animalia; filum: Cnidaria; clase: Anthozoa; orden: Corallimorpharia; familia: Discosomidae; género: *Discosoma*; especie: *D. Striata*

Nombre común: Anémona.

H)

Nombre científico: *Aspergillus terreus*

Taxonomía: Reino: Fungi; filum: Ascomycota; clase: Eurotiomycetes; orden: Eurotiales; familia: Trichocomaceae; género: *Aspergillus*; especie: *A. Terreus*.

Nombre común: *A. terreus*.

I)

Nombre científico: *Streptomyces alboniger*



Taxonomía: Reino: Bacteria; filum: Actinomycetota; clase: Actinomycetia; orden: Streptomycetales; familia: Streptomycetaceae; género: *Streptomyces*; especie: *S. Alboniger*. Nom comú/ Nombre común: *S. Alboniger*

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante:

- (A) Secuencia génica de ADN codificante para la proteína spCas9.
- (B) Secuencia génica de ADN codificante para la proteína RNA polimerasa T7.
- (C) Secuencia génica de ADN codificante para la enzima amino 3'-glycosyl fosfotransferasa.
- (D) Secuencia génica de ADN codificante para la enzima hygromycin B fosfotransferasa.
- (E) Secuencia génica de ADN codificante para la proteína luciferasa (Luc).
- (F) Secuencia génica de ADN codificante para la proteína mNeonGreen.
- (G) Secuencia génica de ADN codificante para la proteína roja mScarlet.
- (H) Secuencia génica de ADN codificante para la enzima Blasticidin S Deaminasa.
- (I) Secuencia génica de ADN codificante para la enzima Puromycin-N-acetiltransferasa.

3) Método de obtención:

En todos los casos:

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

4) Función del gen/genes en el organismo donante:

- A) Expresión del gen de spCas9, que proporciona la capacidad de inducir cortes en secuencias específicas del genoma, facilitando la edición genética mediante un sistema CRISPR-cas9.
- (B) Expresión de la RNA polimerasa de T7, que permite la síntesis de sgRNA a partir de moldes de ADN para la edición genética mediante un sistema CRISPR-cas9.
- (C) Expresión del gen de la amino 3'-glycosyl fosfotransferasa, que proporciona resistencia a la genitocina (G418) y permite la identificación de los parásitos correctamente transfectados.
- (D) Expresión del gen de la hygromycin B fosfotransferasa, que proporciona resistencia a la higromicina y permite la identificación de los parásitos correctamente transfectados.
- (E) Expresión del gen luciferasa para generación de bioluminiscencia.
- (F) Expresión del gen mNeonGreen que proporciona fluorescencia verde.
- (G) Expresión del gen mScarlet, que proporciona fluorescencia roja.
- (H) Expresión del gen de la blasticidin s deaminasa, que proporciona resistencia a la blasticidina y permite la identificación de los parásitos correctamente transfectados.
- (I) Expresión del gen de la puromicin-n-acetiltransferasa, que proporciona resistencia a la puromicina y permite la identificación de los parásitos correctamente transfectados.

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

- SI NO



a) En caso afirmativo, especificar para que organismos:

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

b) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad?

Las bacterias *S. pyogenes* (C) y *K. pneumoniae* (H), así como el hongo *A. terreus* (F), son patógenos humanos. La infección por *S. pyogenes*, suele manifestarse como una infección de las vías respiratorias superiores y las amígdalas. En ocasiones puede presentarse como infección en la piel y partes blandas, y más raramente como infecciones sistémicas y de órganos profundos. La infección por *K. pneumoniae* se caracteriza por afectación de las vías respiratorias bajas (neumonía) o de las vías urinarias (pielonefritis), siendo ambas formas particularmente comunes en pacientes hospitalizados. La infección por *A. terreus* es rara en seres humanos, pero suele manifestarse como infecciones respiratorias bajas (neumonía) o de la piel, siendo particularmente común en pacientes inmunosuprimidos.

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

No.

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

No.

V. INFORMACIÓN RELATIVA A LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

1) Tipo de modificación genética:

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

2) Finalidad de la modificación genética:

A) Conferir la maquinaria molecular necesaria para la utilización de un sistema de edición genética de tipo CRISPR-cas9.

(B) Permitir la transcripción de sgRNA para el sistema CRISPR-cas9 a partir de moldes de ADN.



- (C) Conferir resistencia a la genitocina (G418) para la identificación de los parásitos correctamente transfectados.
- (D) Conferir resistencia a la higromicina y para la identificación de los parásitos correctamente transfectados.
- (E) Conferir bioluminiscencia.
- (F) Conferir fluorescencia verde para la identificación del parásito en tejidos.
- (G) Conferir fluorescencia roja para evidenciar la expresión de una serie de proteínas que se pretende estudiar en el parásito.
- (H) Conferir resistencia a la blasticidina para la identificación de los parásitos correctamente transfectados.
- (I) Conferir resistencia a la puromicina para la identificación de los parásitos correctamente transfectados.

En todos casos las modificaciones realizadas permiten parametrizar el crecimiento de los parásitos en relación a la actividad enzimática que portan (lumínicamente o mediante fluorometría, respectivamente), lo que posibilita su aplicación en ensayos de descubrimiento de fármacos o de comportamiento biológico del parásito. Adicionalmente, la incorporación de mScarlet a los genes de *T. cruzi*: TcCLB.510743.60, TcCLB.510743.50, TcCLB.510659.250, o TcCLB.510659.257, permite identificar la expresión y localización intracelular de sus respectivos productos proteicos. Los genes de resistencia antibiótica incorporados a las distintas líneas son necesarios para poder identificar parásitos transfectados adecuadamente, al cultivarlos en medios diferenciales.

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

En los casos A-F se realizó mediante electroporación de DNA plasmídico linearizado para facilitar y favorecer la integración del mismo en el genoma del parásito mediante mecanismos de recombinación homóloga. En los casos G-I, los productos fueron transfectados mediante electroporación con DNA plasmídico circular en parásitos previamente modificados y expresando los genes A-D. Esto permitió la incorporación de los genes E-I en los segmentos 3' en genes del parásito específicos, mediante la utilización de un sistema CRISPR-cas9.



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

SÍ NO

En caso afirmativo:

Tipo e identidad del vector:

Para la incorporación de los genes (A-F) se utilizaron como vectores los plásmidos de expresión **pLEW-cas9** (para A, B, y C) y **pTRIX2-LucNeon-Hyg** (para D, E y F). Cabe destacar que los genes E y F fueron transfectados como un solo producto originado por la fusión de los dos genes individuales, tal y como se describe en Costa et al. (Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12(4):e0006388). En la publicación se describe el método de construcción del vector y su expresión en un linaje de *Trypanosoma cruzi*, CL Brener.

Los genes en los apartados (G-I) fueron transfectados directamente como productos de PCR, amplificados a su vez de los vectores **pPOTc-blast-blast-3-myc-mScarlet-3-myc** (G y H) y **pTPuro** (I).

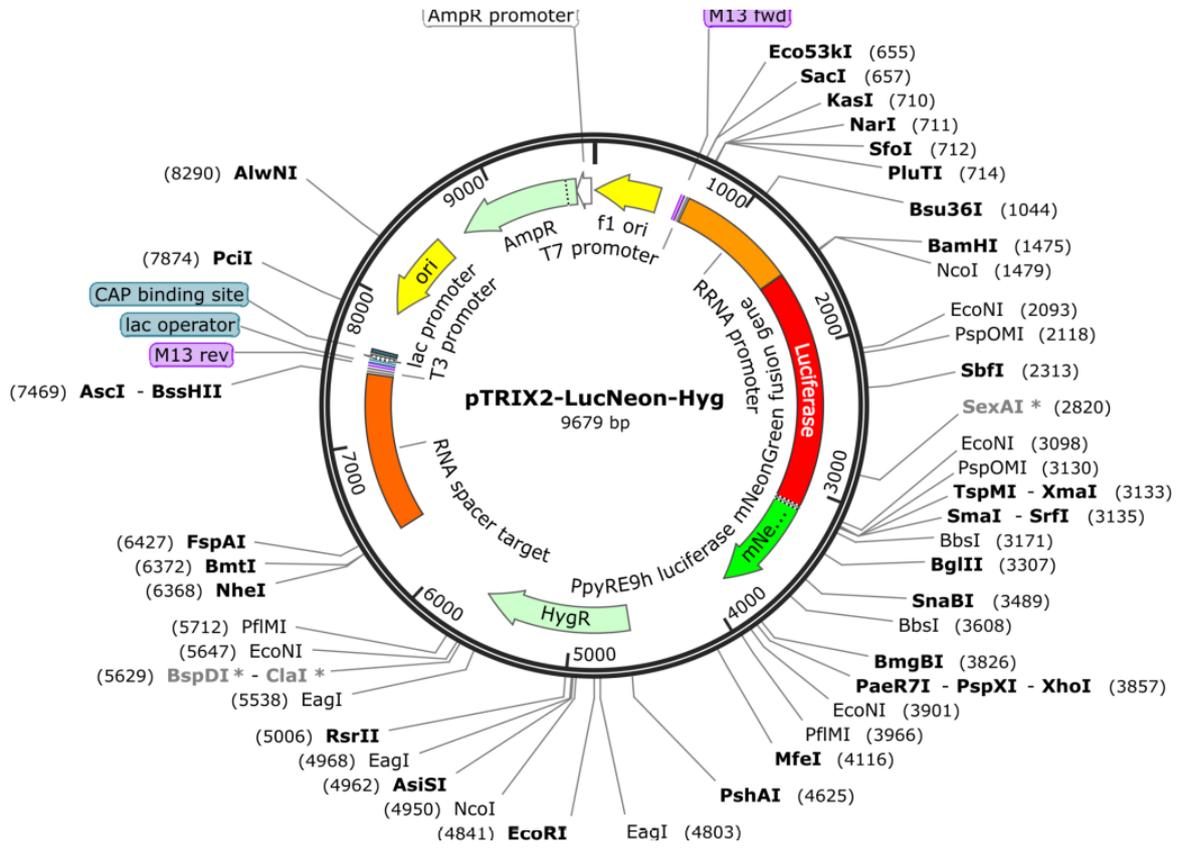
a) Si se trata de un virus: NA.

Es defectivo en replicación SÍ NO

b) 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*):



ii. pTRIX2-LucNeon-Hyg (para D, E y F)





iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?

NA.

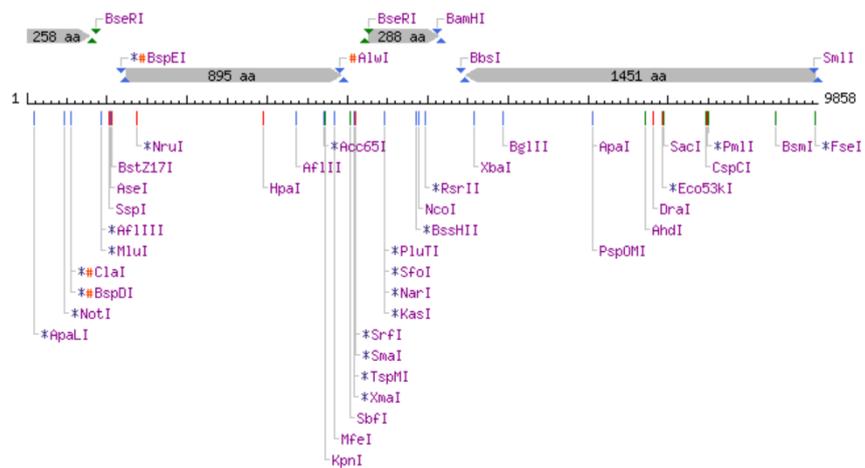
4) Información del inserto:

Inserto 1: Incluye los genes A-C, amplificado de **pLEW-cas9**.

Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia:

Longitud: 9858 bp.

Mapa de restricción:



Secuencia:

```

ctgaccgtatcatgatgactttctccatcatcccatcccccaaggtgtccgacactgtcgtcgagccgtacaatacactctctc
cgtgcaccaactgtggaactccgatgagtcgatgtgcattgacaacgaggcactgtacgatattgcttccgcaccctgaa
actgacaacaccaacgttcggtgacctgaaccacttgggtgtctgtgtgtccggcgtcacctgtgcctgccttccctggt
cagttgaactctgacctccgtaagttggctgtgaacctgtccattcccgcgtctgcacttctcatgatgggcttcgccccgt
gaccagccgcggctcgcagcagtagccggtctctccgtgccgagctaacgcagcagatgttcgatgcgaaaaacatgat
gcaagctcgagatctctgcacggccgtacctgacagcgtctgcacttctccgcccgcgatgtcgacgaaggaggtgat
gagcagatgtgaacgtgcagaacaagaactgtctacttcattgagtgatcgcgcccgaacaacatcaagtcctctgttg
cgatatcccaccaagggactcaagatggctgtcaccttcattggcaacaacctgcacccaggagatgttccgccgtgtgg
gagagcagttcacctcatgttccgtcgaaggcgttctgactggtactggcagggtatggacgagatggaattcacg
gaggcagagtccaacatgaacgatctctgtgtctgagtaccagcagtagcagatgccacgattgaggaggaggggcaggtc
gacgaggaggagcaatactagacgcggacggggcatttccgttcgctcattagcagtagtaataagatgtcgcaggggtg
ctcaagctgtgtagcgcacgcgttctctacatatttcttaacaggcagcgaagcctaacaatacacttgcttatttttggcc
cctcatgtctgtacaaatatttgcgatagcttagctatcagccacattaatcaacaagataccaacaagcccgaaaacataaa
ctcaactgcaacgaagctgggctgcacgcgcttcgagttttttcttttccccattttttcaactgaagactcaattacacca
aaaagtaaaattcacaagctgatctgatccgattfactaactggaagaggcactaaatgaacacgattaacatcgtaagaac
gaattcctcagacctcaaaaaagaagagaaaggtcgaattctctgacatcgaactggctgctatcccgttcaactctggct
gaccattacggtagcgtttagctcgcgaacagttggccttgagcatgagcttacgagatgggtgaagcacgcttccgcaa
gatgtttgagcgtcaactaaagctggtgaggttgcggataacgctgcccaagcctctcatcactaccctactccctaagat

```




cacagcaaggtcttctgaaattcatgttttttttttactctgcattgcagtctccgctcttatttagtttctttacgtaaggctcgt
tgctgccataaaataagcctagaactagagctttcatatgtctagaatggactataaggaccacgacggagactacaaggatc
atgatattgattacaaagacgatgacgataagatggcccaaagaagaagcggaggtcggatccacggagtcceagcag
ccgacaagaagtacagcatcggcctggacatcggcaccaactctgtgggctgggctgacacccagcaggtacaagggtg
cccagcaagaattcaaggtgctgggcaacaccgaccggcacagcatcaagaagaacctgatcggagcctgctgttcga
cagcggcgaaacagccgaggccaccggctgaagagaaccgccagaagaatacaccagacggagaaccggatct
gctatctgcaagagatctcagcaacgagatggccaagtgggacgacagcttctccacagactggaaagctcctctggtg
gaagaggataagaagcacgagcggcaccatcttcggcaacatcgtggacgaggtggcctaccacgagaagtacccca
ccatctaccactgagaaagaactggtggacagcaccgacaaggccgacctgctggctgatctatctggccctggcccaca
tgatcaagttccggggccacttctgatcggggcgaacctgaacccgacaacagcagctgggacaagctgttcatccagct
ggtgcagacctacaaccagctgttcgagggaaaacccatcaacgccagcggcgtggacccaaggccatcctgtctgcca
gactgagcaagagcagacggctggaaaatctgatcggcagctggcggcgagaagaagaatggcctgttcgaaacctg
attgcctgagcctgggctgacccccaaactcaagcaacttcgacctggccgaggatgcaaaactgacgtgagcaag
gacacctacgacgacacctggacaacctgctggcccagatcggcgaccagtacggcagctgtttctggccgccaagaa
cctgtccgacgccatcctgctgagcgacatcctgagagtgaacaccgagatcaccaaggccccctgagcgcctctatgatc
aagagatacagcagcaccaccaggacctgacctgctgaaagctctcgtgcgagcagctgctgagaagtacaaaaga
gattttctcgaccagagcaagaacggctacccggctacattgacggcgagccagccaggaagagttctacaagttcatc
aagccatcctggaaaagatggacggcaccgaggaactgctcgtgaagctgaacagagaggacctgctcgggaagcagc
ggacctcgcacaacggcagcatccccaccagatccacctgggagagctgcacgccattctcggcgggcaggaagatttt
accattctgaaaggacaaccgggaaaagatcgagaagatcctgacctccgcatccctactacgtgggcccctgggccag
gggaaacagcagattcgcctggatgaccagaagagcgggaaacctaccacctggaacttcgaggaagtgggtggac
aagggcgcttccgccagagcttcatcgagcggatgaccaacttcgataagaacctgccaacgagaaggtgctgcccac
gcacagcctgctgtacgagtactcaccgtgtataacgagctgaccaaagtgaatacgtgaccgagggaatgagaagcc
cgcttctgagcggcgagcagaaaaaggccatcgtggacctgctgttcaagaccaaccggaaagtaccgtgaagcagc
tgaaagaggactactcaagaaaatcgagtcttcgactccgtggaatctccggcgtggaagatcggttcaacgcctccctg
ggcacataccacgatctgctgaaaattatcaaggacaaggacttctggacaatgaggaaaacgaggacattctggaagata
tcgtgctgacctgacctgtttgaggacagagatgatcaggaacggctgaaaacctatgccacctgttcgacgacaa
agtgatgaagcagctgaagcggcggagatacaccggctggggcaggtgagccggaagctgatcaacggcatccggga
caagcagtcggcaagacaatcctggatttctgaagtccgacggcttcgccaacagaaactcatgcagctgatccacgac
gacagcctgaccttaagaggacatccagaaaagccaggtgtccggccagggcgatagcctgcacgagcacattgcaa
tctggccggcagccccgccattaagaaggcatcctgcagacagtgaaagtggtggacgagctcgtgaaagtgatggcc
ggcacaagcccgagaacatcgtgatcgaatggccagagagaaccagaccaccagaaggacagaagaacagccgc
gagagaatgaagcggatcgaagagggcatcaaagagctgggagccagatcctgaaagaacccccgtggaaaacacc
cagctgcagaacgagaagctgtacctgtactacctgcagaatggcggggatatgtacgtggaccaggaactggacatcaac
cggtgtccgactacgatgtggaccatcctgtgcctcagagcttctgaaaggacgactccatcgacaacaaggctgctgacca
gaagcgacaagaaccggggcaagagcgacaacgtgccctccgaagaggtcgtgagaagatgaagaactactggcggc
agctgctgaacgccaagctgattaccagagaaaagttcgacaatctgaccaaggccgagagagggcctgagcgaactg
gataaggccggcttcatcaagagacagctggtgaaacccggcagatcacaagcagctggcacagatcctggactcccg
gatgaacactaagtacgacgagaatgacaagctgatccgggaagtgaagtgatccctgaagtccaagctggtgtccgat
ttccggaaggatttcagttttacaaagtgcgcgagatcaacaactaccaccacgccacgacctactgaacgccgtcgt
gggaaccgccctgatcaaaaagtaccctaagctgaaagcgagttcgtgtacggcgactacaaggtgtacgacgtcggga
agatgatcccaagagcagcaggaatcggcaaggctaccgccaagtacttctctacagcaacatcatgaacttttcaag
accgagattaccctggccaacggcgagatccggaaagcggcctctgatcagacaaacggcgaaaccggggagatcgtg
gggataagggccgggattttgccaccgtgcggaaagtgtgagcatgcccagtgaaatcgtgaaaaagaccgaggtg
cagacagggcggcttcagcaaaagatctatcctgcccaagaggaacagcgataagctgatcggcagaagaagactggg
accctaagaagtacggcggcttcgacagccccaccgtggcctattctgtgctgtggtggtgccaagtggaaaaggcgaagt
ccaagaactgaagagtgtaagagctgctggggatcacatcatggaaagaagcagcttcgagaagaatcccatcgact



ttctggaagccaagggctacaaagaagtgaaaaaggacctgatcatcaagctgcctaagtactccctgttcgagctggaaaa
cggccggaagagaatgctggcctctgccggcgaactgcagaagggaaacgaactggcctgcctccaatatgtgaactt
cctgtacctggccagccactatgagaagctgaagggctccccgaggataatgagcagaaacagctgtttgtggaacagca
caagcactacctggacgagatcatcgagcagatcagcgagtctccaagagagtgatcctggccgacgctaactctggacaa
agtgctgtccgctacaacaagcaccgggataagcccatcagagagcaggccgagaatcatccacctgtttaccctgacc
aatctgggagcccctgccgcttaagtactttgacaccaccatcgaccggaagaggtaccagcaccaaagaggtgctg
gacgccacctgatccaccagagcatcaccggcctgtacgagacagcgatcgacctgtctcagctgggagggcgacaaaag
gccggcgccacgaaaaaggccggccaggcaaaaaagaaaaagtaactcgag

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

- B-tub-targ_seq: Origen: 1. Función: Facilitar inserción en el gen de la tubulina B de *T. cruzi*.
- T7 RNA Pol: Origen: 1236. Función: Secuencia de la polimerasa del bacteriófago T7.
- NEO: Origen: 4262. Función: Otorgar resistencia a la neomicina.
- Cas9: Origen: 5701. Función: Secuencia para la enzima Cas9.

b) Descripción del método utilizado para la transformación:

Electroporación.

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

Los genes estructurales T7 RNA Pol, NEO y Cas9 permiten el desarrollo de un sistema de edición genética CRISPR-cas9 y la identificación de los transfectantes en cultivo.

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

El transcrito posee varias secuencias no codificantes pertenecientes a UTRs de *T. cruzi*.

e) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí.

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

No.

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

No.

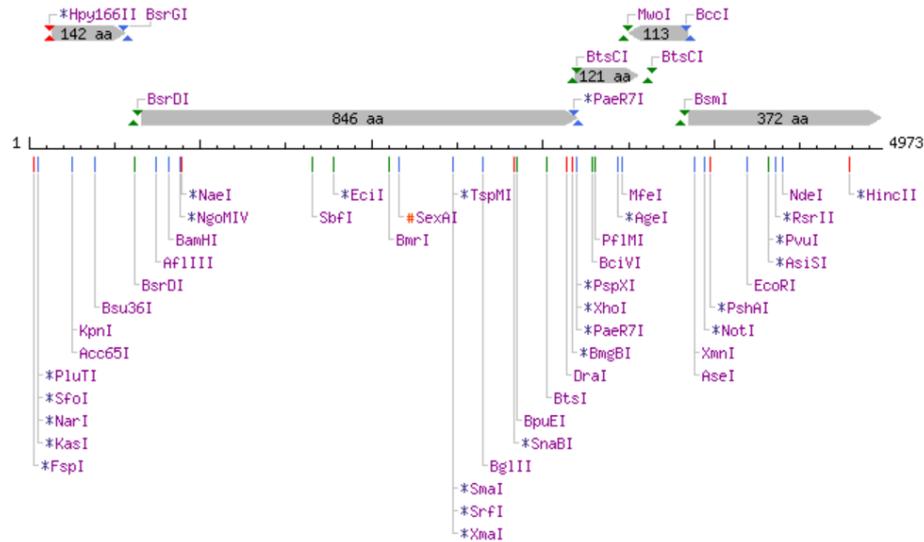


Inserto 2: Incluye los genes D-F, amplificado de **pTRIX2-LucNeon-Hyg**.

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

Longitud: 4973 bp.

Mapa de restricción:



Secuencia:

gacgtcggtgacacctgggatattgcgaccacaccttcccgtcgcaatcgccgctccgaacgcggaaatgtccgaga
 ataatacggctgggctgcccgcgctccccgcgtgaaccaactattgctgatgtgcagcatctattgtgtgctttaccg
 cacaccagttccttgcggggcttattggtgtgttgattttaattttgatgattcggaggaaattttgcaattttgggtaccct
 aaaaaattttggagttccggggctcgatccaactgtgcttttaaccgtccattgtgctagatcatgagcgggtattctc
 tccggtggcccaggtggcgtcgggaaggaatcggtgtccctcaggatgtttggttttcgtttttttgcggtctttgttcgat
 cgccgtatcgtgtcggcgcgacctcttttggctcattggtcagtgaggtttataataaagtgatcattgggttttggcccttt
 gcggcgcaccgcggaatgggggagggatttcataaattgtagtgatcacattgtgtgtggcgcgaaaatgcatgccgt
 gtgcaatgtttattgctgctgtgcgtgtcctttgtattccaccactgtgtgtattttacctatcgtctctccctgccgtggctg
 tgcgtgaattgtgcttcgattcgtgggaatcaaaaggggaatcaacgtgttcttttttcagaaggggagtcaaagcgcg
 tgtgatgccaagtctgtgcaagagttctagtggatccatggaggacccaagaacatcaagaaggaccagccccctcta
 cccctggaggacggcacagccggcgagcagctgcacaaggccatgaagcgggtacgcctggtgccaggcaccatcgc
 cttcaccgacgccacatcgaggtgaacatcacctacgccgagtacttcgagatgagcgtgcggctggccgaggccatgaa
 gcggtacggcctgaacaccaaccaccggtcgtggtgtgcagcgagaacagcctgcagttctcatgccccgtgctgggagc
 cctgttcatcggcgtggcctggccccagccaacgacatctacaacgagcgggagctgctgaacagcatgaacatcagcc
 agcccaccgtggtgttcgtgagcaagaaggcctgcagaagatcctgaatgtcagaagaagctgccatcatccagaaga
 tcatcatcatggacagcaagaccgattaccagggtccagagcatgtacacctcgtgaccagccacctgccccaggcttc
 aacgagtacgacttcgtcccagagcttcgaccgggacaagaccatcgcctgatcatgaacagcagcggcagcaccgg
 cctgccaaggcgtggcctgccccaccggccctgtgctgcggttcagccacgccagagaccatcttcggcaacc
 agatgccccgacaccgccatcctgagcgtggtgcccttcaccacggcttcggcatgtaccacctgggctacctgat
 ctgctggtccgggtgctgatgtacaggttcgaggaggagctgtcctcgggagcctgcaggactacaagatccagac
 cgccctgctggtgccaccctgttcagcttctggccaagagaccctgatcacaagtagcactgagcaacctgcacgag



atcgctctggcggagccccactgagcaaggaggtgggcgagggcctggccaagggtccacctgccagcatccggc
agggctacggcctgaccgagaccaccagcgccatcctggtgacccccatcggcgacgacaagcccggagccgtgggca
aggtggtgccctcttcgaggccaagggtggggacctggacaccggcaagaccctggggtgaaccagagaggcagct
gtgctgagagggccccatgatcatgagcggctacgtgaacaaccccgaggccaccaacgcctgatcacaagggcggc
tggctcacagcggcgacatcgcctactgggacgaggacgagcacttctcatcgtggaccggctgaagagcctgatcaag
tacaagggtaccaggtggccccagccgagctggagagcatcctgctgcagacccccaacccgggagccggagtg
ccggactccccgacgacgacgggagagctgccagccggctgggtgctggagcagccaagaccatgaccgaga
aggagatcgtgactacgtggccagccaggtgaccaccgcaagaagctgagaggcggcgtggtgctgagcaggt
gccaaggcctgaccggcaagctggacgccagaagatccgggagatcctgatcaaggccaagaaggcggcaagat
cacggcggggccggctcggcgacggtctcgaaaggtgaggaagacaatatggccagcttgcagcaacgacgagctt
catatattgggtcgtatcaacgggtggtgatttcgacatggtgggtcaaggcacagtaatcctaatacgggtatgaagaactc
aattgaagagcactaaggagatcctcagtttcccgtgattctgtgccgcatattggttatggtttcatcagtactaccat
acccgatggaatgctgccctccaagcagctatggtggacggctcggggtatcaagtacatgcaccatgcaattgagga
cggagcatccctaccgtaaacctaccgctatacgtatgaggggagccacataaaagggtgaggtcaaggttaaaggcacagg
cttcccagctgacggccccgtcatgaccaattcafaaccgctgctgattggtgccgttctaagaagacctaccctaacgaca
gacgatcattagtagtctttaaagggtataccacaggaacggaaagcggatcgaagcactgctgaacaacctacacatt
tgcaagccaatggccgcaactactgaagaaccagccaatgatggttgcgaaacggaactgaagcattcgaaacc
gagcttaatttaagagtgagcagaaggcgttacagacgtgatggggatggacgaattgtataagtactcagccatttacg
actccaaggcaacgctgcagaacaacctgccgaaggagcggccttctcaagattgtgctggtgacgacaacgagtggg
gatactcccaccgctggtggacttctacgccacatggcctcgaaggatgctcggcaaggtgtaggcgtggcgtgact
caggtcttcttgcgaataggatcttataatacagatgctgctcccgtgatgacgttaccggtgctgccacgatccaattg
acacagcgtcaagagcaaaaacaatttactttcccttaaggacaacaacaaaaaataataactttttttttttttttttga
aattatattatggtcatcttgggaaacaaaaagcgaatttaatatgatcgggaaggatgagtgaaataatgttaataatgatc
gaggattggggtatgcaaggaaaatgtagatgatttaattgggtggtgatgcagcttgggttaattttgctcacttccctttg
ccacatcttttagtttctgcttttcttcccattattccactgtctcttcttcccacgttctcgcacgaatgcagaagtgatatt
ttactttgaaagccatctaccaacaacaattacattgaacagaattgggattgcgaattaattcctgcagccccgctggtggcct
cgaacaccgagcaccctgcagccaatgcggccgatgaaaaagcctgaactaccgcgacgtctgctgagaagtttctga
tcgaaaagttcgacagcgtctccgacctgatgcagctctcggagggcgaagaatctcgtgttctcagctcgtatgtagggg
cgtggatgctcctcgggtaaatagctgcgccgatggttctacaagatcgttatgttatcggcactttgatcggccgct
cccgattccgggaagtgtgacattggggaattcagcagagcctgacctattgatctcccggcgtgacaggggtcacgt
tgcaagacctgctgaaaccgaactcccgtgtctgcagccgctcgggagccatggatgcgacgctcggccgac
ttagccagacgagcgggtcggccattcggaccgaaggaatcggtaataactacatggcgtgattcatatgcgcgatt
gctgatccccatggtatcactggcaaacctggtgatggacgacaccgtcagtcgtccgtcgcgaggtctctgatgagctgat
gctttggccgaggactccccgaagtccggcacctcgtgcacgggatttcggctccaacaatgctctgacggacaatgg
ccgataacagcggctcattgactggagcagggcgtggtcggggattccaatacagaggtcgaacatcttcttggagg
ccgtggttgcttgtatggagcagcagacgcctacttcgagcggagcatccggagcttgcaggatcggcgggctccg
ggcgtatatgctccgattggtcttgaccaactctatcagagcttgggtgacggcaatttcgatgatgcagcttggcgcagggt
cgatgcgacgcaatcgtccgatccggagccgggactgtcgggctacacaaatgcccgagaagcgcggccgtctgga
ccgatggctgtgtagaagtactcgggatagtgaaaccgacgccccagcactcgtccgagggcaagggaatag

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

- RRNA promoter. Origen: bp 659.: Permite el inicio de transcripción del constructo.
- LUC::NEON fusión gene. Origen: 1481. Producto de fusión de los genes de la luciferasa y mNeongreen (D-E). Otorga bioluminiscencia y fluorescencia verde.



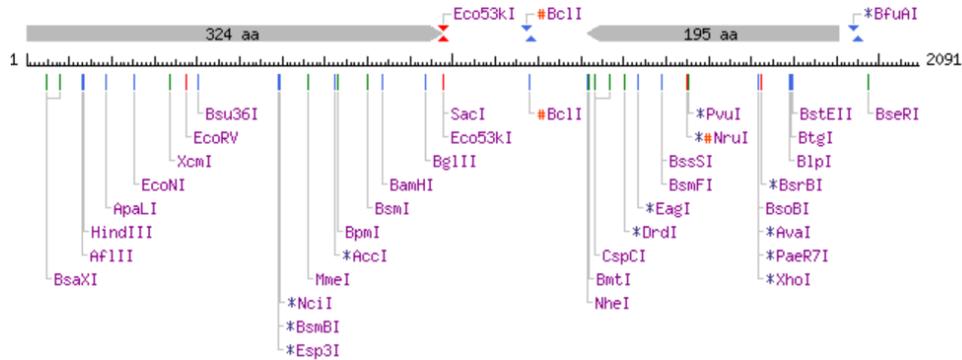
- HygR: Origen: bp 4606: Otorga resistencia a la higromicina.
- c) Descripción del método utilizado para la transformación:
Electroporación.
- d) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:
Los genes estructurales LUC::NEON y HygR otorgan a los parásitos transfectados bioluminiscencia y fluorescencia verde, así como resistencia a la higromicina, respectivamente.
- e) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:
El transcrito posee el promotor RRNA que favorece la integración y transcripción del transcrito. Posee además varias secuencias no codificantes pertenecientes a UTRs de *T. cruzi*.
- f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?
Sí.
- 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.

Inserto 3: Incluye los genes G y H, amplificado de **pPOTc-blast-blast-3-myc-mScarlet-3-myc**.

Dimensiones del inserto, mapa de restricción y secuencia:

Longitud: 2091 bp.

Mapa de restricción:



Secuencia:

atgggttctgtagtggtccggtccggttctgagcagaagctgataagtgaagaagactgggctccgagcaaaagctgatt
 tcggaagaggatctgggctctgagcagaagctgatttctgaagaggatcttaagcttgaagcaaaaggggaggctgtcataaa
 ggaatttatgcgatttaaagtgcacatggaaggagatgaacggccatgagttgaaatagaaggagaggaggaggcg
 cccttacgaaggtactcagacggcgaagctcaaagtactaagggaggtcctctgccgtttagctgggatatactttcacc
 agttcatgtatggcagccgcggttcacgaagcaccgccagatatccccgattactataaacagtcatttctgaggggtca
 agtgggaacgagtaataactttgaggatggtggcgtgtaacgtaacacaagatacctcgtcgaagacggtacgctcat
 ttacaaagtgaagctgcgcgaacaaattccctctgatggaccagtaatgcagaaaagactatgggatgggaagcctcg
 acggaacgtcttaccggaggacggggtgctgaaaggggatataaatggcactccgactgaaagacggcggcaggtga
 tcttctgattttaaaccagtacaagctaaaagccagtgcagatgcctggagcgtataacgtagaccgaaactcgaca
 ttacgtcgataacgaggactatacggtagtcgaacagtagagaggtctgaaggaggcattcaactggtggtatggatga
 gttgtataaggatccgagcagaagctgataagcaggaagacctgggtagtgaacagaagctgatctcagaagaggacct
 tggctcagaacaaaaactcatctcagaggaagatcttggatcaggatctggatcaggatcgggtagttaagagctcggacc
 actgttagaggcatcagtcgcggcgggtgactggcggcaacgcatgccccgcaactatagatagattagcaacgggtg
 ataggaaggagcaagacactggggctgctcggctgacggccacacgtagatataatataatatacacatgtgtgtgtg
 cgtgtgcagtgaggcacgctccccctctgtgatcaccagtcctcatgggcgtccagctgcaccttctctctctctctct
 cttctctttccctcgtctcacacaccgcgcagaaccaagcaaccaagcacacagctaaacaacacagcaaggctagc
 catgctttgtctcaagaagaatccacctcattgaaagagcaacggctacaatcaacagcatccccatctctgaagactacag
 cgtgccagcgcagctctctctagcagcggccgcatctcactgggtgcaatgtatatactttactgggggacctgtgcagaa
 ctcgtggtgctgggactgctgctgctgcggcagctggaacctgactgtatcgtcgcgatcgaaatgagaacaggggc
 atcttagcccctgcggacggtgccgacaggtgcttctcgtatctgcatcctgggatcaaagccatagtgaggacagtgatg
 gacagccgacggcagttgggattcgtgaattgctgcctctggttatgtggtgggagggttaactcagagcggccttcaggc
 caggcgcagggagggggcgaacatgtagatgcacctgggtggccgtcgtcgtgagccacggtgacccacacgtagc
 cctatagaataggattggttgtgtttctttctactgctctctccaactgttgtgtaggtctctgcggcgcctcggcat
 cgggtgctggccgattgtggcgtgccgtgcgttttctctgctttggccgaggtctctgccccgccttctctctcctt
 tgtttccaagatcaaagccaagccaaggaaccaaccatactttattgtattttttttgttttcgagacaagggcacaggtc
 tctcaaattgg

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

- Primer binding site 22. Origen: np 1161: Permite la amplificación de mScarlett dentro del ORF de un gen existente, facilitando el marcaje del mismo.
- trypmScarlet: Origen: bp 1299. Permite la incorporación de la proteína fluorescente mScarlet al extremo 3' o 5' de un gen para otorgarle fluorescencia roja.



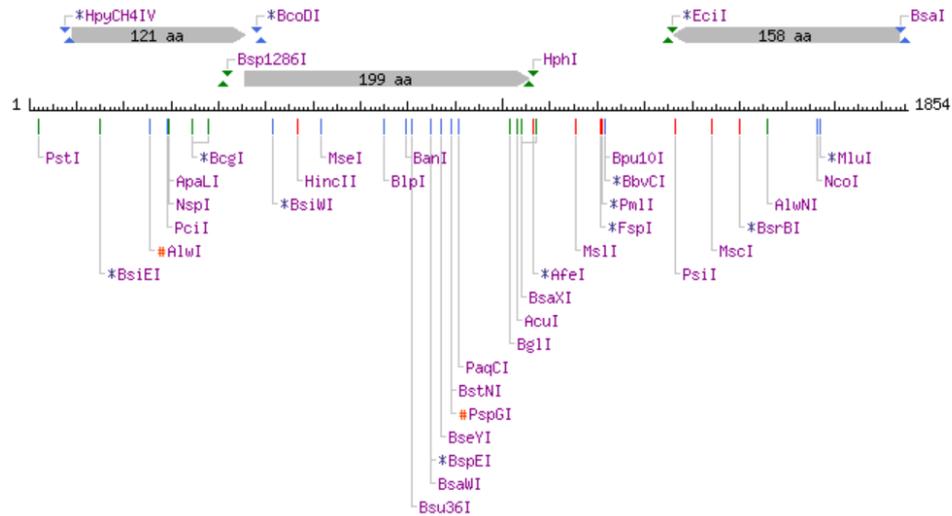
- 5' UTR: Regula la expresión del gen BLAST.
 - BLAST: Origen: bp 2481. Otorga Resistencia a la blasticidina.
- b) Descripción del método utilizado para la transformación:
- Electroporación.
- c) Información sobre los genes estructurales presentes en el inserto:
- Los genes estructurales trypmScarlet y BLAST otorgan fluorescencia roja y resistencia a la blasticidina, respectivamente.
- d) Información sobre los elementos reguladores presentes en el inserto:
- La secuencia 5' UTR permite regular el nivel de expresión del gen BLAST.
- e) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?
- Sí.
- f) ¿Contiene secuencias que no son necesarias para la función deseada? En caso afirmativo, especifíquese.
- No.
- g) ¿Contiene secuencias cuya función es desconocida? En caso afirmativo, especifíquese.
- No.

Inserto 4: Incluye el gen I, amplificado de pTPuro

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

Longitud: 1854 bp.

Mapa de restricción:



Secuencia:

gtataatgcagacctgctgcagccgttgcatgggtgctctctgccgctgccccccccctccccgtctatactgagtac
gttcgtgtgtgtatccgcggcttcacaacgcttgctgggtcaagagggtgcggcgtcgcaccgtcataacacggcgg
acaaggcgcacgcgcacaccacagggtcacgacatcacgagcgtaatcgcacccgcacgacgcggccaacacact
actctctctctcgcgatccccctccccctttctctttgctttcacatgtgcacctccgctctacaggttctctcacgaatctaa
cgaaaacacagttcaccgccgaactacatcgcagctctccccgtgccgtacaatccatctcgccttccactctgagcaca
acaccacattcccacattttctttgctgtttcataatgactgaatacaagccaacggttcgtctgtctacgcgagacgatgtg
ccgcgggcccgtacggacgctggctgctgcgttcgctgattatcccgccaccgacatacgggtgaccagatcgcacattg
agcgagtcacagaactcaagagttattcttaaacacgggtgggctggacattgtaaggttgggttgcggacgatggcgcg
gctgttgcgggtggacgacgccagagtcagtcgaagcgggcgacgtgttctgagatcgggtccccgaatggcggagctt
agcgggtcacgctcgtgcacaacagcagatggaaggtctgttggcaccacatagacctaaaggagccggcttggttcttag
cgacagttggcgtcagtcggaccaccaaggttaaggggctgggttcagcgggtgttctccaggagtagaggctcgggaaa
ggcgaggtgtgccggcttcttgaacgtctgcaccacgtaaccttcttttacgagagattgggggtttacagtaacagcag
atgttgaagtgcctgaagggccgaggacatggtgcatgacacgtaagccgggagcctaagtcgagcgtcacctctgaata
cgcgagtccttttggctcctgctctgacgcctctttctgattctgttctttggctgaagaagtgcacccgatggttcttg
gaacagggacagcaggcgcgctggcggcaaccgctgcgcacgtgccgctgagggaacctcatatattctttttttgtt
ttcattgctaatttctgtgtcttttctcggcctctgtcgcgctgtctccccctctctcaccactgatggggcgctagcaggc
ggaaaggctcagactcctcgttataagtcattagaagggtgcacgggcacacctatgaaggaggaaggggtgctgcgt
ggaaaaggagcgcagttggccagaacgaagcgtgcgcgctgtaggtggcgcgttctgctactttttctctccgctct
gctctggctagcgatectcgcattgccgagtggtgtggcctgctcagagactgcaacactgcttcccggctacgggctgtg
tgtgtcatcgcgtgtgcggcgtgcaacgtgtgtagggggaatacaggcacggctcctctcgcctccgctgcatgac
gcgtcctgtggaagagcctgcctgcggattgccttattcggggcgtcttccatctctcggcagcacaacttctcgcgctgtt
gtcctctgttgttctttggcatctccgcttctgttgggtgatgggtactgcctcgtgttccatgaactacaacgacgcacaggtct
ctcaaattgg

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

- PuroR: bp 3322. Otorga resistencia a la puromicina.

c) Descripción del método utilizado para la transformación:



Electroporación.

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

El gen PuroR otorga resistencia a la puromicina.

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

Posee además varias secuencias no codificantes pertenecientes a UTRs de *T. cruzi*.

f) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí.

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.

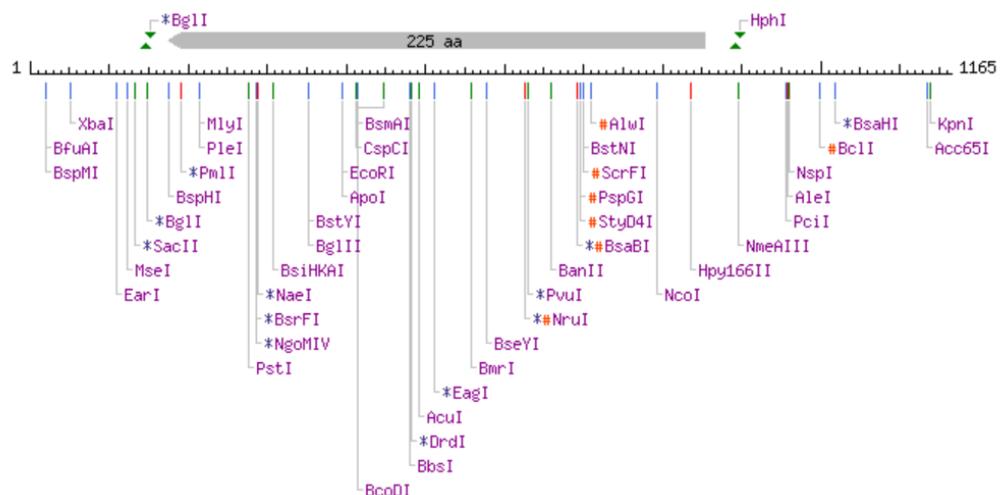
No.

Inserto 5: Incluye el gen H, amplificado de pPOTc-blast-blast-3-myc-mScarlet-3-myc

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

Longitud: 1165 bp.

Mapa de restricción:





Secuencia:

gtataatgcagacctgctgcatccttggcgttcttgttttacaagcgtctagaagcactttttcgtttcttttttgatttaggctcctca
ccctctccgttttttttttaaatgccgcgggacgtagccctctgggcggctcgtggtgcgcgtgtggtttcatgacgggcccgcacgtg
aagtatagaggagctgattgctgtgcgggtggaggtccccgatgctctcgccctgtttgtgtgctgtgtgtttggctgcagctgctctg
ccgctctccgctgatgtgctcttttctctcattttctctgcgtttctgactgctcgcgcaagatctctgcaacaagcaaccagaacca
agtacgaaccaaggaattcatgctttgtctcaagaagaatccaccctcattgaaagagcaacggctacaatcaacagcatccccatctc
gaagactacagcgtcgcagcgcagctctcttagcgcagggcccatctcactggtgcaatgtatatactttactggggaccttgtgc
agaactcgtggtgctggcactgctgctgctgcggcagctggcaacctgactgtatcgtcgcgatcggaaatgagaacagggcatct
tgagccccctgcggacgggtgccgacaggtgcttctgatctgcatcctgggatcaaagccatagtgaaggacagtgatggacagccgac
ggcagttgggattcgtgaattgctgccctctggtatgtgtgggagggctaaccatggggaccactgttagaggcatcagtcggggcg
ggtggactggcggaacgccatgccccgcaactatagatagattgaacgggtgataggaaggagcaagacactggggctgctc
ggctgacggccacacgtagatatatatatacacatgtgtgtgtgctgctgagggcagcctccctctgtatcaccagtc
ctcatggcgctccagctgcacctctctcttttctctttttcttttttgcctcgtctcacacaccgcgagaaccaagcaacc
aagcacacagctaaacaacacagcaagggtacctatgggttctggtagtgttccgg

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

- BLAST: bp 16. Otorga resistencia a la blasticidina.

k) Descripción del método utilizado para la transformación:

Electroporación.

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

El gen BLAST otorga resistencia a la blasticidina.

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

Posee además secuencias no codificantes pertenecientes a UTRs de *T. cruzi*.

n) ¿El inserto ha sido secuenciado completamente?

Sí.

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

No.

p) ¿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: NA

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido? NA

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?:

En caso afirmativo: Si

i) número de copias:

Desconocido en todos los casos.

ii) localización cromosómica:

Desconocido en todos los casos.

iii) secuencias colindantes

iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?:

No.

c) Si se trata de un virus: NA

i) La inserción es específica

ii) La inserción se produce al azar

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas

d) Análisis moleculares realizados relativos a la expresión del producto deseado (*PCR, Northern, secuenciación, otros*):

iv) Determinación de la estructura del inserto (secuenciación)

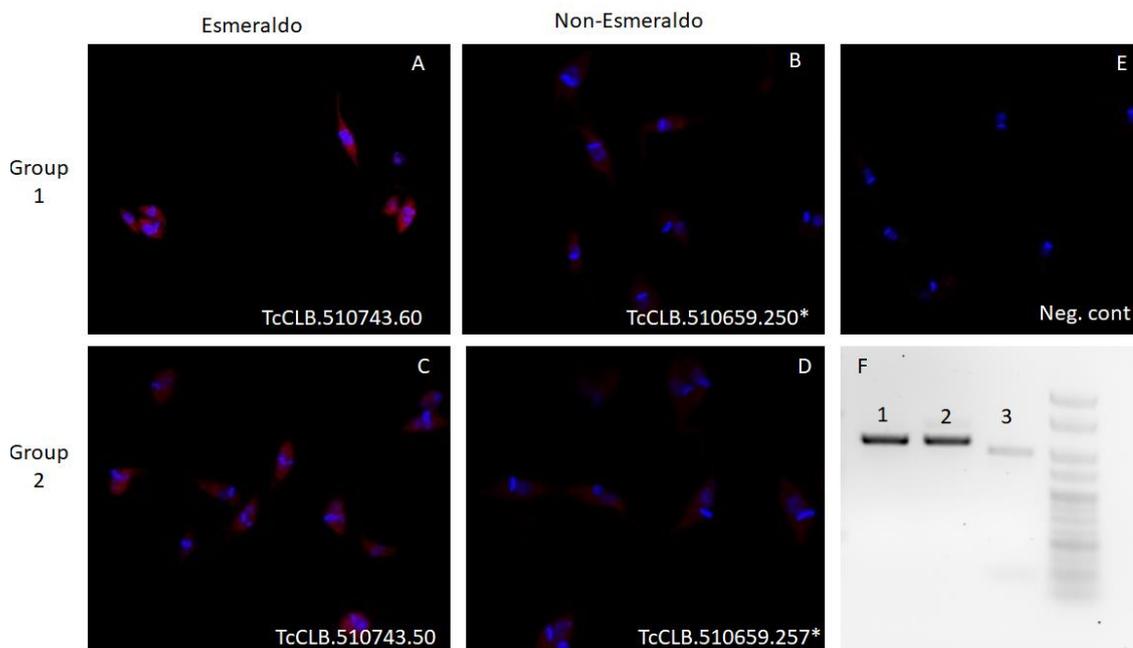
v) Transcripcionales (nivel de síntesis de mRNA)

vi) Traduccionales (nivel de síntesis de proteínas)

Aportar toda la documentación al respecto.

- La correcta expresión de los productos de los genes spCas9, LucNeon, así como de los cassettes de resistencia a higromicina y neomicina ha sido confirmada en la siguiente publicación: Costa FC, Francisco AF, Jayawardhana S, Calderano SG, Lewis MD, Olmo F, Beneke T, Gluenz E, Sunter J, Dean S, Kelly JM, Taylor MC. Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12(4):e0006388).
- La correcta posición de los insertos de mScarlet+BSD fue evidenciada fenotípicamente al confirmar la presencia de fluorescencia roja en los parásitos transfectados, así como evidenciando la presencia de productos de PCR del tamaño correspondiente a los insertos al purificar DNA genómico de las cepas transfectadas (Figura 1). La inserción de los casetes de resistencia a puromicina y blastomicina fue confirmada mediante la amplificación de las secuencias de interés en DNA genómico purificado de los parásitos transfectados (Figura 2). En todos los casos se usó un forward primer específico para una secuencia presente aguas arriba al inserto y un reverse primer específico para una secuencia propia del inserto, por lo que la amplificación de un producto del tamaño esperado indica la adecuada inserción de los moldes de DNA transfectados en el gen diana (datos preliminares no publicados).

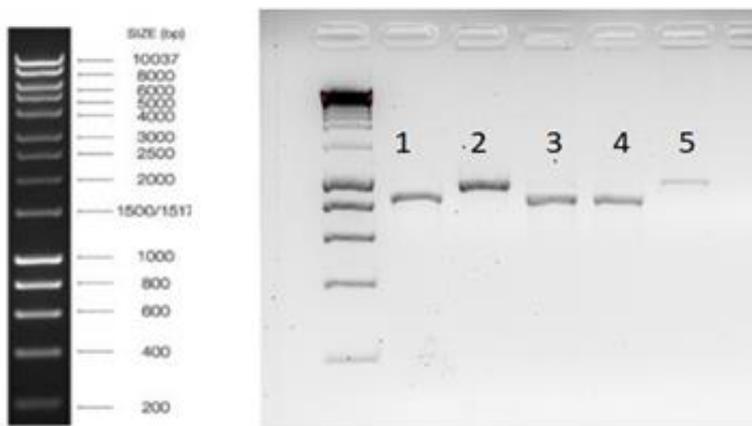
Figura 1:



- 1: Inserción de mScarlet en TcCLB.510743.50, 318 bp.
- 2: Inserción de mScarlet en TcCLB.510659.257, 318 bp.
- 3: Inserción de mScarlet en TcCLB.510743.60, 289 bp.

Productos de PCR de TcCLB.510659.257 no obtenidos por crecimiento lento de los parásitos.

Figura 2:



- 1: Inserción del casete de resistencia a blasticidina en los genes TcCLB.510743.60 y TcCLB.510659.250: 836 bp.
- 2: Inserción del casete de resistencia a puromicina en el locus del gen TcCLB.510743.50. 952 bp.
- 3: Inserción del casete de resistencia a blasticidina en el locus del gen TcCLB.510743.50: 823 bp.
- 4: Inserción del casete de resistencia a blasticidina en el locus del gen TcCLB.510659.257. 826 bp.
- 5: Inserción del casete de resistencia a puromicina en el locus del gen TcCLB.510659.257: 955 bp.

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

a) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la capacidad de supervivencia fuera de las condiciones de cultivo? En caso afirmativo, especifíquese:

No.

b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? En caso afirmativo, especifíquese:

No.

c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? En caso afirmativo, especificar:



No.

- d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? En caso afirmativo, especifíquese:

No.

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

No.

Marcadores específicos del OMG:

En cada caso la expresión del correspondiente gen reportero les diferencia de sus cepas parentales no modificadas.

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

Todas las cepas modificadas solicitadas continúan expresando las proteínas clonadas incluso años después de realizados los clonajes y tras múltiples pases en cultivo. Dicha expresión se realiza en todos los casos en ausencia de la droga de selección, por lo que se trata de microorganismos modificados muy estables genéticamente.

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

Nula.

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

- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG:

Se pueden identificar mediante ensayos específicos para la determinación de la actividad de las proteínas reporteras que portan. Las cepas que portan proteínas fluorescentes (mScarlet y mNeonGreen) pueden ser visualizadas también por medio de técnicas de fluorimetría de flujo o microscopía de fluorescencia.

- b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente:

El OMG no está nunca en el medio ambiente.

VII. DESCRIPCIÓN DE LAS OPERACIONES

- 1) Naturaleza de las operaciones:



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

2) Volumen o cantidad de OMG a utilizar:

- a) Volumen máximo en el caso de microorganismos:

En caso de cultivo para ensayos masivos de cribado de compuestos el máximo volumen que se manejará será inferior a 100 ml de cultivos parasitarios.

- b) Número de plantas: NA.
- c) Número de animales: NA.

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).

El periodo previsto será desde febrero de 2023 hasta fin del proyecto, con una duración inicial estimada de 5 años.

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

La finalidad es determinar el proceso de patofisiología de la infección por *T. cruzi* y testar compuestos químicos que puedan inhibir su replicación y crecimiento en función de los descubrimientos realizados. En última instancia, el objetivo de la investigación es encontrar nuevas terapias frente al mal de Chagas.

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. En el caso de centros españoles, indicar el número de notificación si se conoce:

Todas las cepas descritas en este documento provienen del laboratorio del Profesor John Kelly de la London School of Hygiene and Tropical Medicine (LSHTM), Londres, Reino Unido, registrada en el Health Services Executive del Reino Unido, bajo el número: GM654/99.2.

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 aplicable² (*tipo de transporte, manejo y embalaje, documentación de acompañamiento e identificación o/y etiquetado*):

² Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:



El transporte del microorganismo desde los organismos remitentes a nuestras instalaciones se realizará siguiendo el protocolo definido por la IATA, en cumplimiento de la legislación internacional vigente.

Todas las cepas de *Trypanosoma cruzi* genéticamente modificadas están clasificadas por la IATA como "Dangerous Goods Division 6.2" al ser infecciosas para humanos y animales y estar genéticamente modificadas.

El código es **UN2814** (infectious to humans). Risk group 3: high individual and low community risk (i.e. causes serious disease but does not spread readily, effective treatment and prevention available).

El transporte se realizará con empaquetado definido como **Packing Instruction 602**, que consiste en tres componentes:

- Un receptáculo primario con la sustancia infecciosa con suficiente material absorbente entre el receptáculo primario y el secundario.
- Un receptáculo secundario.
- Un contenedor exterior de al menos 100 x 100 mm.

El receptáculo primario o el secundario serán capaces de resistir una presión interna produciendo un diferencial de no menos de 95 kPa para líquidos entre -40°C y +55°C. El contenedor exterior estará marcado con "inner packagings comply with prescribed specifications". Una lista enumerando los contenidos será incluida entre el receptáculo secundario y el contenedor exterior. El número UN2814, el nombre de envío o técnico y la declaración de envío (3 copias) se adjuntarán con el envío. Una etiqueta de 'UN Class 6.2 'Infectious Substance' será colocada en el contenedor exterior. La dirección completa, nombre y número de teléfono del remitente y del destinatario se colocará visible en el contenedor exterior.

En la sección "Additional handling information" en el paquete se leerá 'Prior arrangements as required by the IATA Dangerous Goods Regulation 1.3.3.1 have been made'. El volumen total de la sustancia infecciosa estará marcado en el exterior del paquete. No se incluirá CO₂, ni ningún otro refrigerante.

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*):

-
- **(ADR) Clase 6.2 (Materias infecciosas)** del Acuerdo Europeo de Transporte Internacional de Mercancías Peligrosas por Carretera y principales modificaciones
 - **Reglamento (CE) n° 1/2005** del Consejo, de 22 de diciembre de 2004, relativo a la protección de los animales durante el transporte y las operaciones conexas y por el que se modifican las Directivas 64/432/CEE y 93/119/CE y el Reglamento (CE) n° 1255/97.
 - **Reglamento (CE) n° 1946/2003** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de julio de 2003, relativo al movimiento transfronterizo de organismos modificados genéticamente [Diario Oficial L 287 de 5.11.2003].
 - **Artículo 18.2.c del Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad**. Documentación acompañamiento en el movimiento transfronterizo: <https://bch.cbd.int/protocol/>



Todas las cepas se cultivarán in vitro en frascos y placas de cultivo celular en un laboratorio tipo P3. Todo el personal será entrenado a tal efecto para cumplir con la normativa vigente actualmente en la instalación en cuanto a la manipulación de otros microorganismos tipo BSL3. Como ya se ha descrito anteriormente, todas las manipulaciones de *T. cruzi* vivo serán confinadas al laboratorio P3 y se realizarán de acuerdo a los protocolos establecidos de manejo de este microorganismo. Se trabajará en placas multipocillo y en frascos de cultivo. Placas y frascos de cultivo previamente sembrados con células provenientes de una línea establecida de mamífero (p.ej. células Vero, 3T3 o LLC-MK2) se inocularán con tripomastigotes del parásito; 18 horas después se retirarán los parásitos que no hayan conseguido ser internalizados mediante suaves lavados con tampón salino fosfato. A efectos de validar el crecimiento de las células parasitarias se procederá a medir las distintas actividades reporteras que porta cada una de las cepas modificadas según convenga. Así mismo también se podría proceder a la cuantificación del crecimiento de las células parasitarias por el incremento de su ADN genómico vía PCR cuantitativa en tiempo real (real time qPCR). Una vez estimada la tasa de replicación, se realizarán estudios de respuesta a distintas condiciones nutricionales en los medios de cultivo para conocer la influencia del metabolismo lipídico en la tasa de crecimiento y el éxito replicativo de los parásitos. En base a los resultados obtenidos también se testarán compuestos tripanocidas en función del tiempo de exposición y de la concentración a la que han sido expuestos a fin de clasificar los compuestos con actividad antiparasitaria en función de su potencia tripanocida y su velocidad de acción.

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

El laboratorio de seguridad biológica contención 3 (laboratorios LSB-3) está situado en la planta -1 del edificio CEK del IDIBAPS. La entrada del laboratorio está señalizada con el símbolo universal de advertencia de riesgo biológico. El acceso a dicho laboratorio está restringido mediante control biométrico de forma que solamente se permite el acceso al personal autorizado.

La conducción de agua es independiente del resto de laboratorios del edificio CEK y en la planta -3 se dispone de un digestor donde son tratados los efluentes. Las conducciones de aire en el laboratorio LSB-3 también son independientes del resto de laboratorios del edificio CEK y la aportación de aire a la sala se realiza a través de cinco filtros y la extracción por tres filtros, en ambos casos son filtros absolutos, HEPA H13. El laboratorio está diseñado para tener una presión negativa de 25Pa entre la zona de trabajo y el pasillo y de 10Pa entre el transfer y el pasillo. La regulación del flujo y de la presión requerida es controlada a través del programa informático "Scada de clima". A su vez, este programa permite el control de la presión negativa de la sala y se activa una alarma cuándo la presión es inferior a los 10Pa negativos.

El laboratorio LSB-3 está dividido en tres zonas bien diferenciadas: zona transfer, zona de trabajo y zona de limpieza. Los espacios entre mobiliario y equipos son accesibles para facilitar una correcta limpieza. Las superficies de trabajo son impermeables al agua, resistentes al calor moderado y a los disolventes orgánicos, ácidos y álcalis, como también a los productos desinfectantes utilizados para descontaminar superficies e instrumentos. Las cabinas de seguridad biológica están instaladas a la distancia necesaria de la puerta de entrada para evitar fluctuaciones. Se dispone de una autoclave de doble puerta, dónde serán introducidos los materiales para ser desinfectados. Para la entrada y salida de material se dispone de SAS de paso biológico y SAS de paso de puertas hinchables que permiten la esterilización con formol y UV según sea necesario. El laboratorio LSB-3 dispone de teléfono y una ventana de



observación de la zona de trabajo, de manera que se pueda ver sus ocupantes, así como comunicar los accidentes o incidentes que se puedan producir. Los laboratorios IDIBAPS disponen de un programa de control de insectos y ratones.

Los usuarios deberán apuntarse en el registro de acceso al laboratorio LSB-3 a la entrada y a la salida. Si el acceso se realiza en fin de semana o fuera del horario laboral el personal también debe registrarse en la recepción del centro ubicada en la planta 0 del edificio CEK para que el personal de seguridad pueda localizarlos en caso de emergencia.

El número mínimo de personas en el LSB-3 será de 2 y el máximo permitido será de 4.

Los usuarios deberán vestirse antes de acceder al laboratorio con los EPI requeridos: ropa de trabajo, bata, gorro, cubre zapatos, mascarilla y doble guante. El acceso se realizará a través del transfer. Las instalaciones están diseñadas para tener una presión negativa entre las diferentes habitaciones de la sección.

El primer usuario que entre en el laboratorio deberá realizar una revisión general de la sala, verificar el correcto funcionamiento de los incubadores y de los congeladores, comprobar el correcto funcionamiento del enclavamiento de las puertas y comprobar que el valor del marcador digital del interior de la sala sea superior a 20Pa negativos. Si el valor de la presión es inferior a los 10Pa negativos o suena la alarma avisar al coordinador/a de los laboratorios IDIBAPS o al personal responsable de vigilancia y control de los LSB-3.

En los laboratorios LSB-3 se seguirán las normas de seguridad biológica y los protocolos de uso de los equipos. Todos los protocolos serán de lectura obligatoria y a la vez todo el personal investigador y ajeno será formado e informado de las normas en un curso realizado por los miembros de la Comisión de P3 de IDIBAPS.

Cuando se realicen procedimientos que puedan generar aerosoles o salpicaduras se utilizarán cabinas de seguridad biológica de tipo II. Por ejemplo: después de la centrifugación, pulverización, agitación, sonicación o apertura de recipientes de materiales infecciosos donde sus presiones internas puedan ser diferentes a la presión ambiental.

Se centrifugarán con tapa de seguridad cuando se utilicen concentraciones altas o volúmenes grandes de agentes infecciosos y deben abrirse en el interior de la cabina de seguridad biológica.

Los usuarios deben seguir el plan de mantenimiento de los equipos aprobado por la comisión del laboratorio LSB-3 y el Comité de Bioseguridad del IDIBAPS. Las instalaciones (climatización y electricidad) y los equipos de los LSB-3 seguirán un plan de mantenimiento anual y de verificación realizadas por empresas externas especializadas.

Cada usuario será responsable de mantener limpia la superficie de trabajo, durante y después de cada uso. Una empresa de limpieza realizará limpiezas periódicas a las instalaciones, siguiendo el protocolo establecido por la Comisión de P3 de IDIBAPS.

Todo el material sólido y líquido (pipetas, frascos, placas, tubos, etc...) que haya tenido contacto con material infeccioso se debe limpiar pasando lejía al 10% por el interior para neutralizar el agente. Una vez neutralizado se puede eliminar en el contenedor de residuos biológicos. La descontaminación de los residuos de los LSB-3 se hará a través de la autoclave de la sala y su eliminación se realizará a través de la empresa CONSENUR que realiza la recogida y gestión de los residuos químicos y sanitarios (grupo III y IV). El contrato fue entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**. Cualquier derrame o incidente que provoque una sobreexposición del personal investigador a materiales infectados deberá ser comunicado al coordinador/a de los laboratorios IDIBAPS o al personal responsable de vigilancia y control de



los LSB-3. Se seguirá el circuito de accidente biológico establecido y redactado por PRL de IDIBAPS.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales:

Ninguna.

El plano de situación fue entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**.

2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:

La temperatura de los laboratorios LSB-3 está controlada entre 21 y 25 °C para el buen funcionamiento de los equipos. El laboratorio está diseñado para tener una presión negativa de 25 Pa entre la zona de trabajo y el pasillo y de 10 Pa entre el transfer y el pasillo.

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:

Existe una sección ubicada en la planta -1 del edificio. Está dividida en tres habitaciones:

- El transfer de personal con control de acceso con lector biométrico y doble puerta con cierre automático. A la vez, subdividido en dos habitaciones, antesala o zona limpia y zona sucia.
- Laboratorio de trabajo P3. Dónde se desarrolla las técnicas de laboratorio y equipado con los instrumentos y equipos necesarios.
- Zona de lavado. Limpieza del material de laboratorio y zona de entrada y salida de material biológico.

Se desarrollará actividad con organismos clasificados tipo III y con organismos Tipo II con los cuales se recomienda trabajar en laboratorios de contención 3.

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

1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

Las normas a seguir fueron las expuestas en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**. Se detallan [apartado 10 y 12](#) del protocolo de funcionamiento del laboratorio LSB-3. También se adjuntó **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11** el Manual de prevención de riesgos en el laboratorio, redactado por el Servicio de Prevención de Riesgos Laborales.

Dentro de las buenas prácticas de laboratorio se tendrá en cuenta los siguientes aspectos:

- Evaluación del riesgo de los agentes biológicos que se manipulen.



- Identificación con el símbolo y signo internacional de advertencia de peligro biológico.
- En el laboratorio se debe llevar ropa protectora apropiada (batas sin abertura delantera o envolventes, trajes de dos piezas de tipo pijama, monos, gorros y, si corresponde, protección para el calzado).
- Toda manipulación abierta de material potencialmente infeccioso debe realizarse dentro de una Cabina de Seguridad Biológica.
- Tener un inventario actualizado de las muestras.

2) Formación del personal adscrito:

En cuanto a las normas de autoprotección, se seguirán las indicadas en el manual de formación e información de prevención de riesgos laborales para el personal de laboratorio investigador y técnico de laboratorio entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**. Se detallan en el ANEXO 13_Actividad Formación e información PRL de la Actividad B.

Se hace entrega de gafas de seguridad y se pone a disposición de todo el personal manuales de actuación en caso de vertidos accidentales y los siguientes equipos de trabajo de protección individual para su utilización en las distintas actividades aplicables:

- **Guantes (nitrilo) conforme EN 374:1, 2 y 3.**
- **Protección respiratoria máscaras: FFP1(con carbón activo), FFP2 y FFP3.**
- **Máscara completa dotada con filtro universal y material absorbente para la recogida de derrames químicos (chemizorb).**
- **Ropa de abrigo para acceder a cámaras frigoríficas y de congelación.**
- **Guantes antitérmicos para la manipulación de material/equipos calientes (autoclave).**
- **Guantes para la manipulación de material frío** (muestras congeladas).
- **Guantes para la manipulación de nitrógeno líquido.**
- Protección auditiva (sonicador).

El personal de nueva incorporación debe leer y aceptar “las normas básicas de trabajo en laboratorios” así como asistir a una sesión informativa sobre este tema.

El personal de nueva incorporación es informado sobre el trabajo que va a realizar, técnicas que empleará, equipos de trabajo, agentes químicos, biológicos y físicos implicados en las tareas a desarrollar. Dicha información la recibe a partir del responsable científico, o del personal técnico del laboratorio al cual se va a incorporar.

Programas de limpieza/desinfección/descontaminación:

Viene descrito en el apartado 15 del Protocolo funcionamiento del laboratorio de seguridad biológica nivel 3 de contención entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**. La limpieza de la sala y la limpieza y desinfección de los filtros HEPA del sistema de ventilación de la sala y de las cabinas de seguridad Biológica están detallados en el protocolo normalizado de trabajo entregado en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**. ANEXO 10a_Actividad B_PNT Descontaminación filtros Hepa. Además, el servicio de seguridad



biológica velará por el cumplimiento de las normas de control de acceso, manipulación, descontaminación, esterilización, sanitización, etc.

También se adjunta en la notificación de instalación el protocolo interno P-011_Protocolo de limpieza de los laboratorios LSB-3, dónde se detalla las limpiezas y descontaminaciones programadas de la sala.

Para el edificio del CEK se dispone de un contrato para el control de plagas con la empresa DEPEC, contrato entregado en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1. ANEXO 12_Actividad Contrato control de plagas.**

3) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento:

El personal lab manager (responsables de vigilancia y control) es el encargado del buen funcionamiento de los laboratorios LSB-3 y del control de los aparatos, autoclave y residuos.

Se adjunto con el Protocolo funcionamiento del laboratorio de seguridad biológica nivel 3 de contención entregado en el ANEXO 6 de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1** las fichas de uso y mantenimiento de cada uno de los equipos e instrumentos que dispone la instalación, detallando la periodicidad del mantenimiento preventivo, las validaciones y revisiones.

Los incubadores serán revisados anualmente.

La centrífuga de alta velocidad es revisada anualmente por la empresa Calservice contrato entregado en el **ANEXO 7** de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1**

El SAS será revisado periódicamente por personal técnico de la empresa Telstar contrato entregado en el **ANEXO 8** de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1**

La autoclave es revisado periódicamente por personal técnico de la empresa MATACHANA contrato entregado en el **ANEXO 9** de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1.**

Los filtros HEPA del sistema de clima y de las cabinas de seguridad biológica se descontaminarán y se revisaran periódicamente según el protocolo entregado como **ANEXO 10** de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-1.**

4) Programas de inspección y control del confinamiento:

El personal de mantenimiento de IDIBAPS realizará unas tareas de mantenimiento de componentes de la sala.

CUADRO DE MANDO Y PROTECCIÓN LSB-3

Se realizará una parada técnica una vez al año y se realizaran las siguientes acciones:

- Verificar la resistencia de tierra.
- Reapretar los contactos eléctricos.
- Comprobar la ausencia de calentamientos anormales.
- Verificar intensidad y tiempo de disparo de las protecciones.
- Verificar la resistencia de aislamiento de los conductores.
- Limpieza de cuadro.
- Revisión luminarias de emergencia.
- Revisión de estado general.

CLIMATIZADORES Y EXTRACCIÓN LSB-3

Los filtros que componen el sistema de climatización tendrán el siguiente mantenimiento:



llo se cerrará correctamente y se pondrá dentro del contenedor negro de 30l. Una vez el contenedor esté lleno se pasará por el SAS y será tratado como un residuo biológico. El desinfectante utilizado a la concentración indicada elimina a todo tipo de agentes infecciosos.

El centro dispone de un digestor (autoclave a 150°C) para poder inactivar los efluentes de las picas de la sala de lavado y ducha. Todo el material sólido y líquido (pipetas, frascos, placas, tubos, etc.) que haya tenido contacto con material infeccioso se debe limpiar pasando lejía al 10% por el interior para neutralizar el agente. Una vez neutralizado la descontaminación de los residuos de los LSB-3 se hará a través de la autoclave de la sala y su eliminación se realizará a través de la empresa CONSENUR.

La gestión de residuos se realiza con gestores autorizados. La descontaminación de los residuos de los LSB-3 se hará a través de la autoclave de la sala y su eliminación se realizará a través de la **empresa CONSENUR** que realiza la recogida y gestión de los residuos químicos y sanitarios (grupo III y IV). El contrato fue entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en ANEXO 11 de la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**.

Se adjuntan procedimientos (gestión interna y gestión externa).

Todo lo que concierne a la gestión de los residuos generados se especifica en los apartados 13 y 14 del Protocolo funcionamiento del laboratorio de seguridad biológica nivel 3 de contención entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**. Este documento es de obligada lectura para todo el personal investigador.

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

1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Tipo de incidencia	Análisis/observaciones
Intrusión.	El acceso al laboratorio LSB-3 es restringido, de modo que sólo puede acceder personal autorizado mediante sistema de huella digital.
Derrame de material biológico	Durante el derrame es factible que se generen aerosoles y salpicaduras pudiendo afectar directamente a los trabajadores del laboratorio LSB-3. Las probabilidades de que se produzca esta incidencia fuera de las cabinas de seguridad biológica son menores ya que fuera de estas no debe trabajarse con material en abierto.



Emisión de agentes biológicos	Interior área de contención	La probabilidad de que se produzca esta incidencia fuera de las cabinas de seguridad biológica es baja ya que fuera de estas no debe trabajarse con material en abierto. Esta incidencia se podría producir en caso de fallo en el funcionamiento de una cabina de seguridad biológica o de un derrame de material infeccioso fuera de cabina (incidencia ya analizada).
	Exterior área de contención	La probabilidad de que se produzca esta incidencia es todavía más baja; esta incidencia se podría producir como concatenación de las incidencias anteriores sumadas al fallo de sendos ventiladores de extracción, conectados en paralelo, del laboratorio LSB-3, perdiéndose los niveles de depresión en el laboratorio respecto del exterior.
Accidente	Accidente biológico	Se entiende accidente con riesgo biológico como aquel en el que se ha producido un contacto con un agente biológico, ya sea de forma percutánea o a través de mucosas: <ul style="list-style-type: none"> - Percutánea: pinchazos, cortes o contacto con piel no intacta. - A través de mucosas: salpicaduras. - Contacto / inhalación de aerosoles.
	Accidente no biológico.	Se entiende como tal, toda lesión no definida como accidente biológico.
Derrame de productos químicos.	Las sustancias empleadas en los laboratorios LSB-3 son alícuotas de p-formaldehído, glutaraldehído y algunas soluciones de MgCl ₂ y NaCl. Los volúmenes de los recipientes que las contienen son de 50 ml máximo	
Incendio y otro tipo de emergencias que puedan ocasionar daños estructurales en los laboratorios LSB-3 (terremotos, explosiones)	En los laboratorios LSB-3 se estima una carga térmica de fuego baja. Principalmente, un inicio de un incendio puede deberse a un fallo eléctrico de la instalación o como consecuencia de una técnica con llama abierta. En los laboratorios LSB-3 hay una autoclave de vapor (equipo a presión).	
Tipo de incidencia	Recursos previstos	
Intrusión.	El acceso al laboratorio LSB-3 es restringido de modo que sólo puede acceder personal autorizado mediante sistema de huella digital. El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.	
Derrame de material	Deberá disponerse del siguiente material para la recogida del	



biológico	<p>derrame, sin perjuicio de otros equipos de protección personal especificados en los procedimientos de trabajo:</p> <ul style="list-style-type: none">- Desinfectante de eficacia probada y activa según el tipo de agente infeccioso.- Guantes conforme EN 374: 1, 2 y 3.- Guantes anticorte (en caso de rotura de material de vidrio).- Gafas de seguridad EN 166 con montura integral.- Mascarilla FFP3.- Bata desechable.- Protección desechable de calzado. <p>El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.</p>
Emisión de agentes biológicos	<p>La instalación dispone de:</p> <ul style="list-style-type: none">- Aviso acústico por flujo demasiado bajo o demasiado alto en las cabinas de seguridad biológica (Nuairé NU-437-400E).- Aviso acústico por pérdida de nivel de depresión negativa requerido en el interior del laboratorio LSB-3. <p>El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.</p>
Accidente	<p>La antecámara dispone de un lavajos y una ducha de emergencia.</p> <p>En la antecámara hay un botiquín con material básico para primeros auxilios.</p> <p>El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.</p>
Derrame de productos químicos.	<p>Deberá disponerse del siguiente material para la atención del derrame:</p> <ul style="list-style-type: none">- Absorbedor inerte.- Guantes conforme EN 374:1, 2 y 3.- Gafas de seguridad EN 166.- Máscara de protección respiratoria con filtro universal, en su grado de protección más alto (A2B2E2K1P3). <p>El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.</p>
Incendio y otro tipo de emergencias que puedan ocasionar daños estructurales en el Laboratorios LSB-3(terremotos,	<p>En área de laboratorio y en antecámara hay instalados detectores de humo conectados a la central de alarmas del edificio.</p> <p>En el caso de ser precisa una evacuación rápida del laboratorio, en función de la gravedad de la emergencia y la capacidad para contenerla, en la salida de los laboratorios LSB-3 hay un</p>



explosiones)	<p>pulsador tipo “seta” que permite anular el bloqueo de las puertas de laboratorio y antecámara. Igualmente, en el pasillo a la entrada de la antecámara hay otro pulsador tipo “seta”, que para ser activado requiere de desbloqueo mediante llave en posesión del personal de Mantenimiento y de Seguridad del edificio CEK.</p> <p>En la antecámara de los laboratorios LSB-3 se dispone de un extintor portátil de anhídrido carbónico. Se desaconseja el uso de otro agente extintor (polvo, agua).</p> <p>El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.</p> <p>El personal autorizado para la entrada en los laboratorios LSB-3 contará con conocimientos básicos en el uso del extintor portátil impartidos dentro de la formación específica para trabajar en dicho laboratorio.</p>
---------------------	---

2) Equipamiento de seguridad (especifíquese):

Todo lo que concierne a los equipos de seguridad, barreras primarias y secundarias de los LSB-3 es detallado en el apartado 12 del Protocolo funcionamiento del laboratorio de seguridad biológica nivel 3 de contención entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**. Este documento es de obligada lectura para todo el personal investigador.

3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores:

En el protocolo de funcionamiento de los laboratorios LSB-3 entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11** se incluye el apartado 17 donde se establecen los siguientes apartados:

- Análisis de incidencias, donde se refleja los tipos de emergencias que se ha considerado pueden ocurrir en el laboratorio.
- Recursos materiales y humanos precisos para hacer frente a las incidencias.
- Protocolos de actuación por parte del personal del laboratorio y personal de los equipos de emergencia del edificio en función de las emergencias que se han analizado.
- Implantación, fundamentada en que el personal autorizado para trabajar en el laboratorio es conocedor del contenido dicho capítulo.

También con el protocolo de funcionamiento del laboratorio LSB-3 se adjunta el Manual de prevención de riesgos en el laboratorio, redactado por el Servicio de Prevención de Riesgos Laborales también entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**.

4) Planes de emergencia:



En la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11** se adjuntó el protocolo interno de los laboratorios IDIBAPS P-008_Protocolo de actuación en caso de emergencia en LSB-3 y evacuación del edificio y Manual de Prevención donde se describen los planes de emergencia del edificio CEK en caso de derrame químico o biológico, accidente laboral y evacuación del edificio.

Barcelona, a 13 de septiembre de 2022.



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

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

- 1) Entidad
Nombre: [Instituto de Salud Global de Barcelona \(ISGlobal\)](#).
Dirección postal: [Carrer Rosselló 132, 08036 Barcelona](#).

- 2) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: [Gonzalo Vicente Lacambra](#).
NIF: [25445668D](#).
Cargo: [Gerente](#).

Tel: [93.227.98.92](#)
Fax: NA

Correo electrónico: oci@isglobal.org

- 3) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos: [Julio Alonso Padilla](#)
NIF: [53408936S](#)
Cargo: [Assistant Research Professor](#)
Tel: [93.227.54.00 ext.: 4284](#)
Correo electrónico: julio.a.padilla@isglobal.org

- 4) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
Nombre y apellidos: [Sandra Piquer Gibert](#)
NIF: [38098454N](#)
Cargo: [Coordinadora laboratorios IDIBAPS](#)
Tel: [\(93\) 2275400 ext.:4388](#)
Correo electrónico: sandra.piquer@idibaps.org

- 5) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto
Nombre y apellidos: [Sandra Piquer Gibert](#).
Tel: [\(93\) 2275400 ext.: 4388](#)
Correo electrónico: sandra.piquer@idibaps.org

II.



II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD.

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

1) Objetivo de la actividad:

Descubrir los mecanismos de patogénesis molecular de la infección con el parásito *T. cruzi*, con particular énfasis en el rol de las fosfolipasas A2 en la síntesis de lípidos con actividad pro-agregante plaquetaria. Identificar compuestos activos que puedan ser potenciales candidatos para estudios preclínicos en animales de experimentación.

2) Duración prevista de la actividad:

El periodo previsto será desde febrero de 2023 hasta fin del proyecto, con una duración inicial estimada de 5 años.

(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).

III. EVALUACIÓN DE RIESGO

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

(En el caso de actividades de tipo 1 se incluirá en este apartado un listado de los principales organismos y material genético utilizados (organismos receptores, organismos donantes, insertos, vectores y organismos modificados genéticamente resultantes), así como la evaluación del riesgo para la salud humana y el medio ambiente de los mismos).

1) Identificación de las propiedades nocivas del OMG, en función de las características del:

(Desarrollar con la extensión que proceda, siguiendo el orden propuesto).

a) Organismo receptor.

Trypanosoma cruzi, agente catalogado de riesgo biológico de nivel 3 en Europa y de nivel 2 en los EE.UU.. En Europa su manipulación debe realizarse con las medidas de protección individual adecuadas dentro de cabinas de flujo laminar en laboratorios de bioseguridad de nivel 3 (NSB3).

b) Organismo donante.



- (A) *Streptococcus pyogenes*.
- (B) Bacteriofago T7.
- (C) *Klebsiella Pneumoniae*.
- (D) *Streptomyces hygrosopicus*.
- (E) *Photinus pyralis*.
- (F) *Branchiostoma lanceolatum*.
- (G) *Discosoma striata*.
- (H) *Aspergillus terreus*.
- (I) *Streptomyces alboniger*.

Las bacterias *S. pyogenes*, *S.* (C) y *K. pneumoniae* (H), así como el hongo *A. Terreus* (F), son patógenos humanos. Sin embargo, los genes de interés en cada uno de estos organismos no están involucrados en sus mecanismos de patogenicidad.

c) Inserto.

Inserto 1: Contiene los genes A, B y C:

- (A) Gen codificante para la proteína spCas9.
- (B) Gen codificante para la proteína RNA polimerasa T7.
- (C) Gen codificante para la enzima amino 3'-glycosyl fosfotransferasa.

Inserto 2: Contiene los genes D, E, F:

- (D) Gen codificante para la enzima hygromycin B fosfotransferasa.
- (E) Gen codificante para la proteína luciferasa (Luc).
- (F) Gen codificante modificado para la proteína mNeonGreen.

Inserto 3: Contiene el gen G y H:

- (G) Gen codificante modificado para la proteína mScarlet.
- (H) Gen codificante para la enzima Blastocidin S Deaminasa.

Inserto 4: Contiene el gen I:

- (I) Gen codificante para la enzima Puromycin-N-acetiltransferasa.

Inserto 5: Contiene el gen H:

- (H) Gen codificante para la enzima Blastocidin S Deaminasa.

Ninguno de estos genes incrementa la patogenicidad del organismo receptor.

d) Vector.

- (A-C): pLEW-cas9
- (D-F): pTRIX2-LucNeon-Hyg
- (G, H): pPOTc-blast-blast-3-myc-mScarlet-3-myc
- (I): pTPuro.

e) Organismo modificado genéticamente resultante.

- a. Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal.



T. cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Además de a humanos puede infectar a perros, ratones y otros animales mamíferos domésticos y silvestres. El parásito alterna su ciclo de vida entre un huésped vertebrado (reservorio; seres humanos y animales) y un huésped invertebrado (insecto vector; triatomíneos). Cabe destacar que *T. cruzi* necesita de la fase vectorial para su transmisión natural y que los insectos vectores que lo transmiten (triatomíneos) no se encuentran en Europa pues son endémicos de América.

La enfermedad de Chagas tiene una fase aguda y otra crónica. Si no se trata, la infección puede cronificar y durar toda la vida.

a. La fase aguda ocurre inmediatamente después de la infección, puede durar hasta 10-12 semanas durante las que se pueden encontrar los parásitos en la sangre circulante (parasitemia). La infección puede ser leve o asintomática. Puede haber fiebre o inflamación alrededor del sitio de inoculación (lugar donde el parásito penetró la piel o la membrana mucosa). En casos poco frecuentes, la inflamación aguda puede dar lugar a una fuerte inflamación del músculo cardíaco o del cerebro y de la capa que lo recubre.

b. Después de la fase aguda, la mayoría de personas infectadas entran en una etapa prolongada y asintomática de la enfermedad (llamada fase "crónica indeterminada"), durante la cual se encuentran muy pocos o ningún parásito en la sangre. En esta etapa, la mayoría de los afectados no saben que tienen la infección. Muchas personas pueden no presentar síntomas durante toda la vida. Sin embargo, se calcula que entre un 30% y un 40% de las personas infectadas presentarán problemas médicos debilitantes y a veces potencialmente mortales a lo largo de la vida. Las complicaciones de la enfermedad de Chagas crónica pueden ser: (i) anomalías del ritmo cardíaco que pueden causar muerte repentina; (ii) dilatación del corazón, el cual no bombea bien la sangre; (iii) dilatación del esófago o del colon, que causa dificultades para comer o para evacuar. En las personas con sistemas inmunitarios deprimidos (por ejemplo, debido al SIDA o a la quimioterapia), la enfermedad de Chagas puede reactivarse con los parásitos que se encuentran en el torrente sanguíneo. Esta situación puede potencialmente agravar la enfermedad.

b. Efectos para el medio ambiente.

No tiene.

2) Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

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

Tipo 1



- Tipo 2
- Tipo 3
- Tipo 4

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

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

El trabajo con parásitos vivos debe ser siempre realizado en cabinas de flujo de bioseguridad. Los tubos u otros contenedores que contengan parásitos vivos no pueden abrirse fuera de la cabina. Las mucosas (nasal, bucal, conjuntiva) y la piel con heridas son potenciales sitios de infección. También existe la posibilidad de infección si el parásito es ingerido. Por lo que es necesario trabajar bajo medidas de, y en condiciones de bioseguridad. Se deben utilizar siempre guantes protectores y tubos sellados a la hora de centrifugar. Es importante evitar todos los objetos que puedan ser punzantes (vidrio o metal) en el entorno de trabajo, por lo que se utilizará solamente material de plástico en la manipulación del patógeno.

- b) Concentración y escala utilizadas.

Fruto de su cultivo estándar en células hospedadoras el parásito puede llegar a ser producido en concentraciones de hasta 1×10^7 - 5×10^7 células por ml. Para los experimentos planteados no se usarán mayores concentraciones que las indicadas.

- 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).

El parásito no es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo (medio de cultivo celular y presencia de células mamíferas que le sirven de hospedadoras). No genera estructuras de resistencia. Sus nichos ecológicos no existen en Europa ya que los vectores que lo transmiten son endémicos de América. No posee implicaciones en procesos ambientales. Respecto a su interacción con otros organismos, *T. cruzi* infecta insectos triatominos, que son el vector de la infección, pero como se ha dicho, estos insectos solo se encuentran en América y no existen en España. *T. cruzi* puede infectar una gran variedad de especies animales (mamíferos) pero precisa del vector para transmitirse de forma natural.

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

T. cruzi es potencialmente patógeno para seres humanos y animales mamíferos. En el caso del parásito muerto (inactivado) o sus productos extracelulares, no son considerados infecciosos.



La clasificación en la UE es tipo 3 (Directiva 2000/54/CE). En EE.UU. es tipo 2 según clasificación del NIH (NIH_Appendix B-II-C, Risk Group 2 (RG2) – Parasite Agents).

5) Determinación del riesgo en el caso de que se produzca una liberación accidental:

El parásito no es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo (medio de cultivo celular y presencia de células mamíferas que le sirven de hospedadoras). No genera estructuras de resistencia. Sus nichos ecológicos no existen en Europa ya que los vectores que lo transmiten son endémicos de América, por lo que no hay organismos a nivel natural que puedan reproducir el ciclo parasitario como sucede en regiones endémicas. No posee implicaciones en procesos ambientales. No hay riesgo en caso de producirse tal liberación debido a las razones anteriormente expuestas.

(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 situación del edificio CEK dónde se encuentran los laboratorios IDIBAPS está descrita en el Plano de situación entregado en la Actividad B que corresponde a los indicados en la **notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11**.

El laboratorio de seguridad biológica contención 3 (laboratorios LSB-3) está situado en la planta -1 del edificio CEK del IDIBAPS. La entrada del laboratorio está señalizada con el símbolo universal de advertencia de riesgo biológico.

La conducción de agua es independiente del resto de laboratorios del edificio CEK y en la planta -3 se dispone de un digestor donde son tratados los efluentes.

Las conducciones de aire en el laboratorio LSB-3 también son independientes del resto de laboratorios del edificio CEK y la aportación de aire a la sala se realiza a través de cinco filtros y la extracción por tres filtros, en ambos casos son filtros absolutos, HEPA H13. El laboratorio está diseñado para tener una presión negativa de 25 Pa entre la zona de trabajo y el pasillo y de 10 Pa entre el transfer y el pasillo.

La regulación del flujo y de la presión requerida es controlada a través del programa informático “Scada de clima”. A su vez, este programa permite el control de la presión negativa de la sala y se activa una alarma cuándo la presión es inferior a los 10Pa negativos.

La temperatura de los laboratorios LSB-3 está controlada entre 21 y 25 °C para el buen funcionamiento de los equipos.

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

Tipo de incidencia	Análisis/observaciones
Intrusión.	El acceso al laboratorio LSB-3 es restringido, de modo que sólo puede acceder personal autorizado mediante sistema de



		huella digital.
Derrame de material biológico		<p>Durante el derrame es factible que se generen aerosoles y salpicaduras pudiendo afectar directamente a los trabajadores del laboratorio LSB-3.</p> <p>Las probabilidades de que se produzca esta incidencia fuera de las cabinas de seguridad biológica son menores ya que fuera de estas no debe trabajarse con material en abierto.</p>
Emisión de agentes biológicos	Interior área de contención	<p>La probabilidad de que se produzca esta incidencia fuera de las cabinas de seguridad biológica es baja ya que fuera de estas no debe trabajarse con material en abierto.</p> <p>Esta incidencia se podría producir en caso de fallo en el funcionamiento de una cabina de seguridad biológica o de un derrame de material infeccioso fuera de cabina (incidencia ya analizada).</p>
	Exterior área de contención	<p>La probabilidad de que se produzca esta incidencia es todavía más baja; esta incidencia se podría producir como concatenación de las incidencias anteriores sumadas al fallo de sendos ventiladores de extracción, conectados en paralelo, del laboratorio LSB-3, perdiéndose los niveles de depresión en el laboratorio respecto del exterior.</p>
Accidente	Accidente biológico	<p>Se entiende accidente con riesgo biológico como aquel en el que se ha producido un contacto con un agente biológico, ya sea de forma percutánea o a través de mucosas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Percutánea: pinchazos, cortes o contacto con piel no intacta. - A través de mucosas: salpicaduras. - Contacto / inhalación de aerosoles.
	Accidente no biológico.	<p>Se entiende como tal, toda lesión no definida como accidente biológico.</p>
Derrame de productos químicos.		<p>Las sustancias empleadas en los laboratorios LSB-3 son alícuotas de p-formaldehído, glutaraldehído y algunas soluciones de MgCl₂ y NaCl. Los volúmenes de los recipientes que las contienen son de 50 ml máximo</p>
Incendio y otro tipo de emergencias que puedan ocasionar daños estructurales en los laboratorios LSB-3 (terremotos, explosiones)		<p>En los laboratorios LSB-3 se estima una carga térmica de fuego baja.</p> <p>Principalmente, un inicio de un incendio puede deberse a un fallo eléctrico de la instalación o como consecuencia de una técnica con llama abierta.</p> <p>En los laboratorios LSB-3 hay una autoclave de vapor (equipo a presión).</p>



--	--

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

Tipo de incidencia	Recursos previstos
Intrusión.	<p>El acceso al laboratorio LSB-3 es restringido de modo que sólo puede acceder personal autorizado mediante sistema de huella digital.</p> <p>El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.</p>
Derrame de material biológico	<p>Deberá disponerse del siguiente material para la recogida del derrame, sin perjuicio de otros equipos de protección personal especificados en los procedimientos de trabajo:</p> <ul style="list-style-type: none">- Desinfectante de eficacia probada y activa según el tipo de agente infeccioso.- Guantes EN 374:1,2 y 3.- Guantes anticorte (en caso de rotura de material de vidrio).- Gafas de seguridad EN 166 con montura integral.- Mascarilla FFP3.- Bata desechable.- Protección desechable de calzado. <p>El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.</p>
Emisión de agentes biológicos	<p>La instalación dispone de:</p> <ul style="list-style-type: none">- Aviso acústico por flujo demasiado bajo o demasiado alto en las cabinas de seguridad biológica (Nuair NU-437-400E).- Aviso acústico por pérdida de nivel de depresión negativa requerido en el interior del laboratorio LSB-3. <p>El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.</p>
Accidente	<p>La antecámara dispone de un lavaojos y una ducha de emergencia.</p> <p>En la antecámara hay un botiquín con material básico para primeros auxilios.</p> <p>El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.</p>
Derrame de productos químicos.	<p>Deberá disponerse del siguiente material para la atención del derrame:</p> <ul style="list-style-type: none">- Absorbedor inerte.- Guantes conforme EN 374:1, 2 y 3.



	<ul style="list-style-type: none">- Gafas de seguridad EN 166.- Máscara de protección respiratoria con filtro universal, en su grado de protección más alto (A2B2E2K1P3). <p>El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.</p>
Incendio y otro tipo de emergencias que puedan ocasionar daños estructurales en el Laboratorios LSB-3 (terremotos, explosiones)	<p>En área de laboratorio y en antecámara hay instalados detectores de humo conectados a la central de alarmas del edificio.</p> <p>En el caso de ser precisa una evacuación rápida del laboratorio, en función de la gravedad de la emergencia y la capacidad para contenerla, en la salida de los laboratorios LSB-3 hay un pulsador tipo “seta” que permite anular el bloqueo de las puertas de laboratorio y antecámara. Igualmente, en el pasillo a la entrada de la antecámara hay otro pulsador tipo “seta”, que para ser activado requiere de desbloqueo mediante llave en posesión del personal de Mantenimiento y de Seguridad del edificio CEK.</p> <p>En la antecámara de los laboratorios LSB-3 se dispone de un extintor portátil de anhídrido carbónico. Se desaconseja el uso de otro agente extintor (polvo, agua).</p> <p>El personal autorizado para acceder a los laboratorios LSB-3 deberá conocer y aplicar lo reflejado en este procedimiento.</p> <p>El personal autorizado para la entrada en los laboratorios LSB-3 contará con conocimientos básicos en el uso del extintor portátil impartidos dentro de la formación específica para trabajar en dicho laboratorio.</p>

d) Planes de emergencia.

Los laboratorios IDIBAPS disponen de un protocolo de actuación en caso de emergencia en LSB-3 y evacuación del edificio y Manual de Prevención y corresponden a los indicados en la notificación de la instalación de tipo 3: A/ES/13/I-11. En ellos se describen los planes de emergencia del edificio CEK en caso de derrame químico o biológico, accidente laboral y evacuación del edificio.

Barcelona, a 09 de enero de 2023.