



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

Nº de Notificación:

I. INFORMACIÓN GENERAL

1) Responsables de la actividad

a) Entidad

Nombre: Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPBLN-CSIC).

Dirección postal: Parque Tecnológico de la Salud

Avenida del Conocimiento, 17

18016 Armilla (Granada)

b) Representante legal de la entidad

Nombre y apellidos: Fuencisla Matesanz del Barrio

NIF: 13114121G

Cargo: Directora

Tel: 958181668

Fax:

Correo electrónico: direccion@ipb.csic.es

c) Responsable científico de la actividad

Nombre y apellidos: Dolores González Pacanowska

NIF: 22463712A

Cargo: Investigador Principal y Responsable Servicio Científico IPBLN

Tel: 958 181631

Fax: 958 181632

Correo electrónico: dgonzalez@ipb.csic.es

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

Nombre y apellidos: Fuencisla Matesanz del Barrio

NIF: 13114121G

Cargo: Directora

Tel: 958 181668

Fax:

Correo electrónico: segbiologica@ipb.csic.es, direccion@ipb.csic.es

e) Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: direccion@ipb.csic.es



- 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.

SI NO

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

-Nombre de la convocatoria:

-Referencia del Proyecto y referencia IP del mismo:

-Organismo financiador:

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

a) Fecha de comunicación / autorización de la instalación: 20-08-19

b) Número de referencia del expediente: A/ES/19/I-17

II. DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD:

- 1) Finalidad de la actividad: Ensayo de compuestos, colecciones y quimiotecas frente a *Leishmania donovani* para evaluar su citotoxicidad.

- 2) Clasificación de la actividad:

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

Tipo 1

Tipo 2

Tipo 3

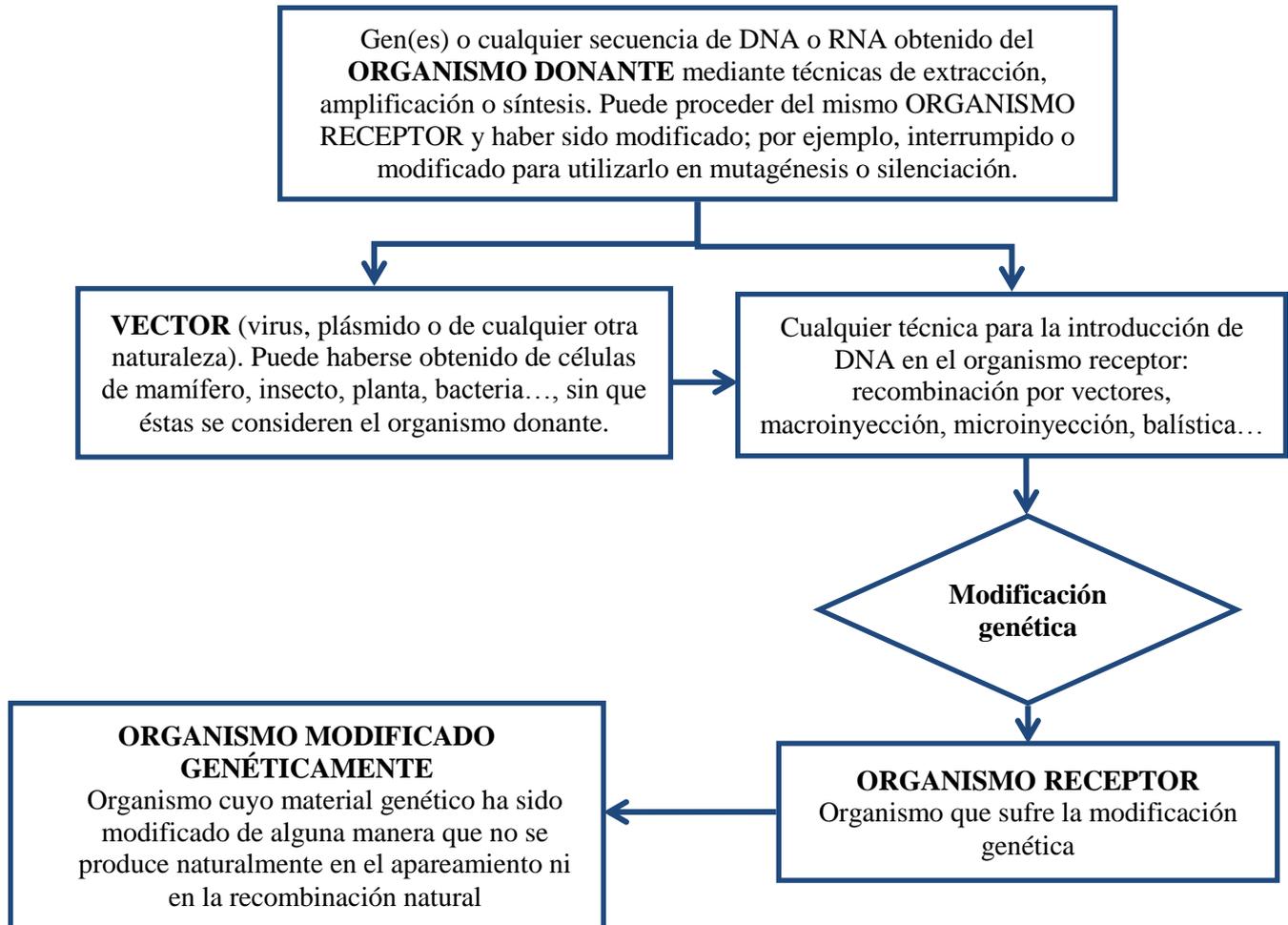
Tipo 4

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.



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





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

1) Nombre científico: *Leishmania donovani* HU3

Taxonomía: Reino: Protista; Subreino; Protozoa; Phylum: Euglenozoa; Clase:

Kinetoplastea; Orden: Trypanosomatida; Familia: Trypanosomatidae; Género:

Leishmania; Especie: *donovani*

Nombre común: *Leishmania donovani*

2) Descripción de los métodos de identificación y aislamiento.

a) Técnicas de aislamiento: *L. donovani* se puede aislar de tejidos humanos, principalmente bazo, ganglio linfático y médula ósea, utilizando medios de cultivo específicos para su crecimiento in vitro.

b) Técnicas de identificación: examen microscópico, cultivo de aspirados, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), diagnóstico serológico (IFI, ELISA)

c) Marcadores genéticos: miniexón y *hsp79*

d) Marcadores fenotípicos: *L. donovani* en su forma promastigote o extracelular tiene forma fusiforme y alargada, con flagelo y de un tamaño alrededor de 20-30 μm , mientras que la forma intracelular o amastigote tiene forma ovoide, de tamaño entre 2 y 5 μm y sin flagelo.

e) Estabilidad genética: Estable

3) Posibles modificaciones genéticas anteriores: No

4) ¿Se considera patógeno el organismo receptor?

SI NO

5) En caso afirmativo, especificar para qué clase de los organismos (*seres humanos, animales, plantas*) se considera patógeno este organismo, vivo o muerto, y/o sus productos extracelulares: *Leishmania donovani* vivo es potencialmente patógeno para seres humanos y animales. En el caso de organismos muertos o sus productos extracelulares no son considerados patógenos.

6) Si el organismo receptor es patógeno para los seres humanos, especificar el grupo de riesgo asignado de acuerdo con la legislación comunitaria existente, (*en particular la Directiva 2000/54/CE*) o según otros sistemas de clasificación, nacionales o internacionales (*OMS, NIH, etc.*): La clasificación en la CE es tipo 3 (Directiva 2000/54/CE)



a) ¿De qué modo se manifiesta la patogenicidad? *L. donovani* es el causante de la leishmaniosis visceral o kala-azar, la forma clínica más grave de la leishmaniosis. Una vez que los parásitos y macrófagos infectados invaden órganos y tejidos hematopoyéticos (hígado, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea), infectan macrófagos locales y causan los síntomas de la leishmaniosis visceral. Los principales signos clínicos incluyen picos irregulares de fiebre, pérdida de peso hasta la caquexia, agrandamiento de hígado y bazo y anemia más pancitopenia. Tras la remisión, frecuentemente aparece una secuela llamada leishmaniosis cutánea post kala-azar, con erupciones maculares, papulares o nodulares en cara, brazos y tronco: estos enfermos son importantes reservorios del parásito. **La transmisión del parásito no es aérea, y precisa del vector para transmitirse de manera natural.**

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

SI NO

Porqué: No es el caso porque la cepa es virulenta

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

8) Experiencia adquirida en relación con la seguridad en la utilización del organismo receptor: El trabajo con parásitos vivos se realiza siempre en cabinas de flujo de bioseguridad. Los tubos u otros contenedores que contengan parásitos vivos no se abren fuera de la cabina. Se deben utilizar doble guantes protectores y batas hidrófobas siempre que se manejen parásitos vivos. Si es necesario centrifugar, se utilizan tubos sellados. En la manipulación habitual de los parásitos vivos, se utiliza material plástico desechable romo, no se usan materiales cortantes ni de vidrio.

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

a) ¿El organismo receptor es capaz de sobrevivir fuera de las condiciones de cultivo?: NO

En caso afirmativo:

b) Capacidad de crear estructuras de resistencia o letargo:

i) esporas

ii) endosporas

iii) quistes

iv) esclerocios

v) esporas asexuales (hongos)

vi) esporas sexuales (hongos)

vii) otros, especifíquese



- c) Otros factores que afectan la capacidad de supervivencia:
- d) Posibles nichos ecológicos:
- e) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

10) Efectos posibles sobre el medio ambiente:

- 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: existe interacción con el flebotomo transmisor, a partir de mamíferos infectados en fase aguda.

11) Distribución geográfica y tipo de ecosistema en el que se encuentra el organismo receptor: La leishmaniosis visceral causada por *L. donovani* es endémica de India, países de África y suroeste asiático. En 2020, más del 90% de los nuevos casos notificados a la OMS se produjeron en 10 países: Brasil, China, Eritrea, Etiopía, India, Kenya, Somalia, Sudán, Sudán del Sur y Yemen.

12) Hábitat natural del organismo: Las leishmanias se transmiten por la picadura de flebótomos hembra infectados, que necesitan ingerir sangre para producir huevos. La epidemiología de la leishmaniasis depende de las características de las especies del parásito y de los flebótomos, de las características ecológicas de los lugares donde se transmite, de la exposición previa y actual de la población humana al parásito y del comportamiento humano. Hay unas 70 especies animales, entre ellas el ser humano, que son reservorios naturales de *Leishmania*. El ciclo de actividad de los flebotomos comienza al atardecer y continúa durante las primeras horas de la noche, y al amanecer. En general, se pueden encontrar flebotomos en zonas húmedas y con oscuridad: su hábitat suelen ser áreas rurales o lugares con árboles en las ciudades, como jardines y parques.

IV. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO DONANTE

1) Nombre científico: *Photinus pyralis*

Taxonomía:

Nombre común: Luciérnaga

2) Tipo de material genético obtenido del organismo donante: secuencia del gen codificante para la proteína luciferasa

3) Método de obtención:

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



- 4) Función del gen/genes en el organismo donante: el gen expresa la proteína luciferasa, responsable de la bioluminiscencia de la luciérnaga y especies similares.
- 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?
- c) Las secuencias insertadas: ¿están implicadas de alguna forma en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?
- 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: detección de los parásitos vivos mediante una reacción luciferina + ATP + luciferasa expresada por el parásito + oxígeno. Para llevar a cabo dicha reacción es necesario la congelación previa de los parásitos durante al menos 18 horas, y la adición del tampón de lisis celular para liberar la enzima luciferasa.
- 3) Método utilizado para llevar a cabo la modificación genética: La modificación genética se realizó por transfección y recombinación homóloga. Para ello se utilizó el vector pLEXYHyg-Luc, que porta el gen de la luciferasa: la recombinación tiene lugar en el locus ARN ribosomal 18S.

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

SÍ NO

En caso afirmativo:

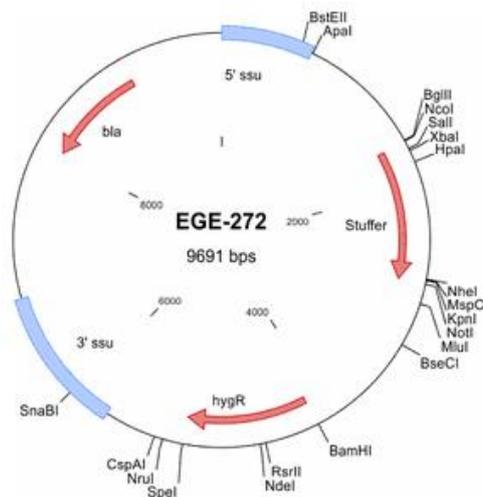
a) Tipo e identidad del vector: pLEXSY-hyg2 (Jena Biosciences)

b) Si se trata de un virus:

Es defectivo en replicación SÍ NO

c) Aportar mapa de restricción del vector (*funciones y posición de genes estructurales, genes marcadores, elementos reguladores, sitios de inserción, origen de replicación, origen, función y secuencia de otros elementos presentes en el vector*):

nt 1-686:	Región 5' del 18S rRNA de <i>Leishmania</i> sp (5' ssu)
nt 704-1253:	Fragmento promotor de rRNA de <i>Leishmania donovani</i>
nt 1716-1738:	sitio de clonado múltiple (MCS)
nt 2715-2732:	sitio de clonado múltiple (MCS)
nt 2733-2753:	secuencia de hexahistidina sequence y codón de parada.
nt 4110-5135:	Gen marcador Hyg codificante para la Hygromycin fosfotransferasa.
nt 5743-6827:	Región 3' del 18S rRNA de <i>Leishmania</i> sp (3' ssu)
nt 6832-9688:	Gen marcador pBluescript II KS (-) con ori y beta-lactamasa (bla)





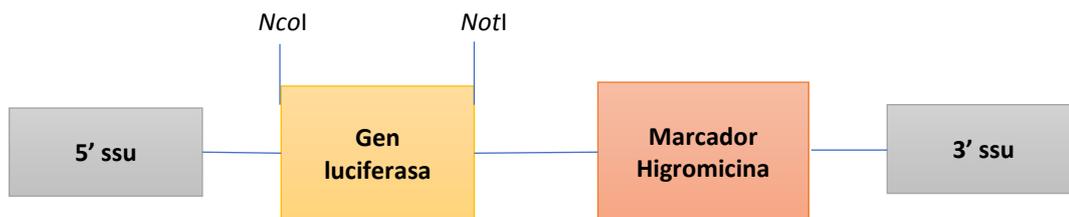
- d) Gama de hospedadores del vector: Bacterias
- e) Características de la movilidad del vector: No posee.
 - i) factores de movilización
 - ii) Si el vector es un bacteriófago ¿se han inactivado sus propiedades lisogénicas?
 - iii) ¿Puede el vector transferir marcadores de resistencia a otros organismos?

5) Información del inserto:

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

Dimensión del inserto: 6287 pb

El vector original se linearizó con la enzima *SwaI* para permitir la recombinación homóloga de los genes luciferasa y marcador higromicina en la región 18s RNA.



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

El inserto del plásmido de expresión tiene la región 5' y 3' de la región 18s RNA de *Leishmania sp*, que franquean al gen de la higromicina fosfotransferasa y el gen de la luciferasa.

- c) Descripción del método utilizado para la transformación:

Los parásitos en fase estacionaria se electroporaron con 3 µg de ADN, y se seleccionaron primero en medio líquido y posteriormente en medio sólido en presencia de 100 µg/mL de higromicina.

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

Ninguno

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

Ninguno



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



VI. INFORMACIÓN RELATIVA AL ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1) Estado y expresión del material genético introducido:

a) ¿Es un plásmido libre? No

En caso afirmativo:

i) Número de copias:

ii) ¿El plásmido recuperado corresponde al construido?

b) ¿Está integrado en los cromosomas nucleares?: Sí

En caso afirmativo:

i) número de copias: 1

ii) localización cromosómica: 18s RNA

iii) secuencias colindantes: regiones 5' y 3' de 18s RNA

iv) ¿La inserción activa o inactiva la expresión de otros genes?: No

c) Si se trata de un virus:

i) La inserción es específica

ii) La inserción se produce al azar

iii) Existe la posibilidad de formación de partículas víricas

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

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.

García-Hernández R, Gómez-Pérez V, Castanys S, Gamarro F (2015) Fitness of *Leishmania donovani* Parasites Resistant to Drug Combinations. *PLoS Negl Trop Dis* 9(4): e0003704

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? No
 - b) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta al modo o tasa de reproducción? No
 - c) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad para el hombre, plantas o animales? No
 - d) ¿Es diferente el OMG del receptor en lo que respecta a los posibles efectos sobre el medio ambiente? No
 - e) ¿Es diferente el OMG en cuanto a las características nutricionales? No
 - f) Marcadores específicos del OMG: luciferasa (luc) e higromicina fosfotransferasa (hyg)
- 3) Estabilidad genética del OMG (*Estado y secuencia del inserto después de un cierto número de generaciones*): el inserto es estable en cultivo en presencia de 100 µg/mL de higromicina.
- 4) Posibilidad de transferencia de material genético a otros organismos: Ninguna.
- 5) Descripción de métodos de identificación y aislamiento empleados:
- a) Técnicas utilizadas para la identificación del OMG: Selección mediante higromicina, PCR y detección de la actividad luciferasa.
 - b) Técnicas empleadas para aislar el OMG en el medio ambiente: No se encuentra 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: 3×10^5 parásitos por pocillo
 - b) Número de plantas:
 - c) Número de animales:



3) Periodo previsto para la actividad de utilización confinada:

El periodo previsto será de 6 años, principalmente en el proyecto colaborativo en el que participamos financiado por el National Institute of Health (EEUU). Al obtener esta autorización, se podrá incluir en la plataforma de cribado de compuestos frente a patógenos parásitos descrita a continuación.

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

Los ensayos están destinados a ensayar compuestos, colecciones y quimiotecas frente a *L. donovani* para evaluar su toxicidad. El ensayo se realizará en placas multipocillo (96 y 384), formato que permite el cribado de un elevado número de compuestos frente al parásito cultivado in vitro.

La autorización para trabajar con este OMG, facilitaría la incorporación de este organismo a la plataforma del servicio científico, puesto en marcha en nuestro centro (cuya responsable es Dolores González-Pacanowska), de ensayo de colecciones de compuestos frente a parásitos protozoos, el cual permitirá al ensayo sobre las formas amastigotas intracelulares de *L. donovani*, una mayor reproducibilidad y robustez de los ensayos y factores Z dentro de los límites 0,5-1. Este servicio ofrece prestaciones tanto al personal interno como personal externo de otros centros o del sector privado.

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: No

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*):

La línea transformada no procede de otro centro o instalación, y no está contemplada su traslado a otro centro o instalación.

² Legislación vigente que afecta al transporte de OMG:

- **(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/>



- 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*):

Los cultivos se realizarán en las cabinas de seguridad biológica tipo II que se hallan en la sala de cultivos NCB3 del IPBLN con número de notificación al MAPAMA A/ES/19/I-17, según procedimientos de trabajo descritos para ésta. La concentración esperada (densidad) de parásitos será hasta 3×10^5 promastigotes por pocillo

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

El cultivo in vitro se llevará a cabo en el IPBLN. El IPBLN cuenta un laboratorio de seguridad nivel 3 (NCB3) y ha sido acreditado por la Dirección General de Relaciones Laborales y Seguridad y Salud Laboral de la Consejería de Empleo (Junta de Andalucía) para el uso de Agentes Biológicos de grupo 3 (RD 664/1997) con referencia de expediente N° 2016/GR/01. Las medidas aplicadas seguirán la normativa del Centro específicas en esta materia.

VIII. INFORMACIONES ADICIONALES RELATIVAS A LA UBICACIÓN DE LA INSTALACIÓN

- 1) Proximidad a fuentes de peligro potenciales: NO
- 2) Descripción de las condiciones climáticas predominantes:
- 3) Notificación de la instalación: indicar las secciones donde se desarrolla la actividad objeto de la notificación, con indicaciones de la categoría de confinamiento prevista. La actividad será desarrollada en el laboratorio de cultivos NCB3 del IPBLN

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

- 1) Adopción de las Buenas Prácticas de Laboratorio:

El trabajo en el área P3 se realiza conforme a las Buenas Prácticas de Laboratorio. Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con n° de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso

- 2) Formación del personal adscrito: El responsable de laboratorio e investigador principal del proyecto, además de su larga experiencia en el trabajo con parásitos intracelulares, ha realizado el protocolo de autorización de acceso de usuarios al P3 en el IPBLN, que conlleva una formación en el uso y manipulación de organismos de riesgo biológico P3 y de protocolos de trabajo dentro de la instalación P3 del IPBLN. Protocolo que ha sido aprobado por el SPRL del CSIC y validado por la Consejería de Empleo, Empresa y Comercio (Junta de Andalucía) para aprobar el uso de la Instalación P3.
- 3) Programas de limpieza/desinfección/descontaminación: Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con n° de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso.



- 4) Programas de mantenimiento de aparatos para el confinamiento: Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso.
- 5) Programas de inspección y control del confinamiento: Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso.

X. GESTION E INACTIVACIÓN DE RESIDUOS

1) Encargado de la gestión de residuos:

- | | | | | |
|-------------------------------------|----|-------------------------------------|----|--------------------------|
| a) gestión interna: | SÍ | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |
| b) gestión por una empresa externa: | SÍ | <input checked="" type="checkbox"/> | NO | <input type="checkbox"/> |

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

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

RESIDUOS SÓLIDOS

El responsable interno del Servicio de Lavado y Esterilización del IPBLN se encargará de estas tareas:

- Se quitarán las bolsas de autoclave y contenedores amarillos de desechos de las 2 cabinas, así como la bolsa de autoclave de la sala de trabajo y la bolsa de autoclave del transfer (contiene EPIS de desecho).
- Éstos serán autoclavados posteriormente.
- Se colocarán nuevas bolsas y contenedores (añadiendo un poco de lejía a cada contenedor)
- Se sacarán los residuos ya autoclavados por el sistema SAS, asegurándonos que la luz UV incida en la mayor parte de la superficie de los mismos.
- Tras ello, serán retirados por la empresa externa STERYCYCLE que procederá a su gestión final.

RESIDUOS LÍQUIDOS: CONTENEDORES DE ASPIRACIÓN DE LÍQUIDOS

Descripción:

Están situados al lado de las Cabinas de Seguridad Biológica. Tienen un recipiente de 2 l de capacidad, siendo autoclavable. Y está conectado a tubo de aspiración de silicona



con cierre de seguridad para el seguro intercambio de la botella. La botella se cambia cuando el líquido llegue al nivel de seguridad o en cualquier caso una vez a la semana.

Los residuos líquidos inactivados con Lejía, se verterán por la pila del sistema BIOWASTE evitando salpicaduras. Tras ello, la garrafa ya inertizada saldrá a través del SAS y su contenido se verterá en la depuradora general del Instituto.

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

- 1) Condiciones en las que podría producirse un accidente:

Relacionadas con el cultivo del microorganismo, tales como generación de aerosoles, o casos de punción o corte. Muchos de estos supuestos están contemplados y la tendencia es minimizarlos, mediante el uso adecuado de EPIS, utilización de centrífugas con cestillos de seguridad así como de material de plástico que sustituya al vidrio como en pipetas Pasteur, pipetas, portaobjetos y cubreobjetos de plástico etc.

- 2) Equipamiento de seguridad (especifíquese): Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso.
- 3) Descripción de la información suministrada a los trabajadores: Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso.
- 4) Planes de emergencia: Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso.



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

Nº de Notificación:

I. RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD

- 1) Entidad
- 2) Nombre: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra
Dirección postal: Parque Tecnológico de la Salud. Avda Conocimiento, 17. 18016 Armilla (Granada)
- 3) Representante legal de la entidad
Nombre y apellidos: Fuencisla Matesanz del Barrio
NIF:13114121G
Cargo: Directora
Tel: 958181668
Fax:
Correo electrónico: direccion@ipb.csic.es
- 4) Responsable científico de la actividad
Nombre y apellidos: Dolores González Pacanowska
NIF: 22463712A
Cargo: Investigador Principal y Responsable Servicio Científico IPBLN
Tel: 958 181631
Fax: 958 181632
Correo electrónico: dgonzalez@ipb.csic.es
- 5) Responsable de bioseguridad de la instalación donde se realizará la actividad
Nombre y apellidos: Fuencisla Matesanz del Barrio
NIF: 13114121G
Cargo: Directora
Tel: 958181668
Fax: Correo electrónico: direccion@ipb.csic.es, segbiologica@ipb.csic.es

II. Indicar cuál de los anteriores actuará como persona de contacto: direccion@ipb.csic.es



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: Ensayo de compuestos, colecciones y quimiotecas frente a *Leishmania donovani* para evaluar su citotoxicidad
- 2) Duración prevista de la actividad: El periodo previsto será de 6 años, principalmente en el proyecto colaborativo en el que participamos financiado por el National Institute of Health (EEUU). Además, la autorización para trabajar con este OMG, facilitaría la incorporación de este organismo a la plataforma del servicio científico, puesto en marcha en nuestro centro (cuya responsable es Dolores González-Pacanowska), de ensayo de colecciones de compuestos frente a parásitos protozoos, el cual permitirá al ensayo sobre las formas amastigotas intracelulares de *L. donovani*. Este servicio ofrece prestaciones tanto al personal interno como personal externo de otros centros o del sector privado

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: *Leishmania donovani* HU3. El microorganismo receptor, *L. donovani*, es el causante de la leishmaniosis visceral o kala-azar, la forma clínica más grave de la leishmaniosis. Una vez que los parásitos y macrófagos infectados invaden órganos y tejidos hematopoyéticos (hígado, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea), infectan macrófagos locales y causan los síntomas de la leishmaniosis visceral. Los principales signos clínicos incluyen picos irregulares de fiebre, pérdida de peso hasta la caquexia, agrandamiento de hígado y bazo y anemia más pancitopenia. Tras la remisión, frecuentemente aparece una secuela llamada leishmaniosis cutánea post kala-azar, con erupciones maculares, papulares o nodulares en cara, brazos y tronco: estos enfermos son importantes reservorios del parásito. La transmisión del parásito receptor no es aérea, y precisa del vector flebotomo para transmitirse de manera natural.
- b) Organismo donante: *Photinus pyralis*, no patógeno.
- c) Inserto: El inserto del plásmido de expresión tiene la región 5' y 3' de la región 18s RNA de *Leishmania* sp, que franquean al gen de la higromicina fosfotransferasa y el gen de la luciferasa, lo cual no tiene un potencial efecto nocivo.



- d) Vector: pLEXY-hyg2 (Jena Biosciences) es un esqueleto de un DNA plasmídico y no se espera que afecte al carácter nocivo del OMG.
- e) Organismo modificado genéticamente resultante: *L. donovani* HU3 Luc. Comparte los riesgos del organismo receptor inicial, sin afectarse ni su vía de transmisión ni su patogenicidad.
- f) Efectos para la salud humana y la sanidad animal y vegetal: *L. donovani* es el causante de la leishmaniosis visceral o kala-azar, la forma clínica más grave de la leishmaniosis. Una vez que los parásitos y macrófagos infectados invaden órganos y tejidos hematopoyéticos (hígado, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea), infectan macrófagos locales y causan los síntomas de la leishmaniosis visceral. Los principales signos clínicos incluyen picos irregulares de fiebre, pérdida de peso hasta la caquexia, agrandamiento de hígado y bazo y anemia más pancitopenia. Tras la remisión, frecuentemente aparece una secuela llamada leishmaniosis cutánea post kala-azar, con erupciones maculares, papulares o nodulares en cara, brazos y tronco: estos enfermos son importantes reservorios del parásito. **La transmisión del parásito no es aérea, y precisa del vector para transmitirse de manera natural. El OGM generado no varía su vía de transmisión ni afecta a su infectividad ni a su patogenicidad.**
- g) Efectos para el medio ambiente: No se prevén. Las líneas del parásito modificadas genéticamente no serán en ningún momento liberadas. Se mantendrán confinadas y su uso está restringido a experimentación en el laboratorio

2) Clasificación inicial del organismo modificado genéticamente:

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

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

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

- a) Características de la/s actividad/es (medidas de confinamiento y control, y exposición humana y ambiental). Las actividades se realizarán en instalaciones de bioseguridad de nivel 3 durante el cultivo en el IPBLN (BSL3)
- b) Concentración y escala utilizadas: 3×10^5 parásitos por pocillo
- c) Condiciones de cultivo (se tendrá en cuenta el entorno potencialmente expuesto, la presencia de especies susceptibles, supervivencia del OGM y efectos sobre el



entorno físico). Trabajo en habitación con confinamiento tipo 3, siempre en cabina de bioseguridad tipo II según las normas del IPBLN.

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

En el IPBLN el cultivo in vitro de las líneas modificadas genéticamente se llevará a cabo en laboratorios de bioseguridad nivel 3 y conforme a las Buenas Prácticas de Laboratorio del centro. Esta instalación ya ha sido notificada con nº A/ES/19/I-17

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

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

- a) Información adicional relativa a la ubicación de la instalación (proximidad a fuentes de peligro potenciales, condiciones climáticas predominantes, etc.) N/A
- b) Condiciones en las que podría producirse un accidente.
El trabajo con parásitos vivos se realiza siempre en cabinas de flujo de bioseguridad. Los tubos u otros contenedores que contengan parásitos vivos no pueden abrirse fuera de la cabina. Se deben utilizar doble guantes protectores y batas hidrófobas siempre que se manejen parásitos vivos. Si es necesario centrifugar, se utilizan tubos sellados. Es importante evitar todos los objetos que puedan ser punzantes (vidrio o metal).
- c) Equipos de seguridad, sistemas de alarma y métodos de confinamiento adicionales. Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso.
- d) Planes de emergencia. Información detallada en la parte B relativa a la Instalación que ya fue aportada para el expediente de con nº de notificación A/ES/19/I-17, por lo que no será aportada en este caso.