



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE UNA VACUNA RECOMBINANTE CONTRA LA TUBERCULOSIS (B/ES/12/36)

Características, objetivo y duración del ensayo:

El Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), de la Universidad Complutense de Madrid, ha presentado esta notificación para realizar una prueba de vacunación en cabras frente a la tuberculosis con la cepa *M. tuberculosis* SO2 atenuada en su virulencia por la delección del gen *phoP*.

El OMG procede de la instalación A/ES/09/I-07 (actividad A/ES/09/07) de la Universidad de Zaragoza, autorizada por CIOMG en diciembre de 2009.

Los objetivos de este ensayo son:

- Determinación de la eficacia de *Mycobacterium tuberculosis* SO2 como alternativa vacunal en animales domésticos y salvajes, basándose en diferentes indicadores de protección (niveles de anticuerpos, grado de lesión, etc.) y probando diferentes dosis y vías de administración.
- Estudio de la interferencia ocasionada por la vacunación con *M. tuberculosis* SO2 en el diagnóstico de la tuberculosis mediante las pruebas de base celular, intradermotuberculinización (IDTB) y detección de interferón-gamma (IFN- γ).

Se determinará la eficacia del mutante en el gen *phoP* de *M. tuberculosis* SO2 como alternativa vacunal frente a la tuberculosis en ganado caprino infectado experimentalmente, concretamente en 24 animales, 12 vacunados y 12 controles en la granja experimental de la Facultad de Veterinaria de la UCM. El ensayo se realizará en la granja experimental del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria.

Procedimiento: Antes del comienzo del ensayo se realizará una prueba para confirmar que los animales no están inmunizados contra la tuberculosis. Una vez confirmado que los animales son aptos, se utilizará un grupo de animales (12) para probar la vacuna elaborada con *M. tuberculosis* SO2 *phoP* y el resto de animales serán empleados como controles (no vacunados pero infectados). Tras aplicar la vacuna y antes de llevar a cabo la infección experimental, se recogerán muestras de sangre, semanal y quincenalmente, para detección de IFN-gamma, y se realizará una prueba IDTB con objeto de valorar las interferencias diagnósticas ocasionadas por la vacuna. Tras la infección, se recogerán muestras de sangre semanalmente/quincenalmente para la prueba de detección de IFN-gamma y se realizará una IDTB.

El sacrificio de los animales se realizará, en el propio cobertizo, 4 meses después de la vacunación. Los cadáveres se introducirán en doble bolsa de galga gruesa, sellándose con bridas y cinta americana para su traslado desde la granja al laboratorio de contención de nivel 3 de VISAVET (instalación ya Notificada A/ES/11/I-22), donde se realizará una necropsia completa de los animales para valorar las lesiones (si las hubiese) y recoger muestras para cultivo bacteriológico. Las lesiones se compararán con las encontradas en los animales infectados no vacunados.



Características de la granja experimental:

Se trata de una parcela de aproximadamente 200 metros cuadrados, limitada por un cerco de acero en cuyo interior se encuentra un cobertizo de unos 70 metros cuadrados donde se alojarán las cabras. El cobertizo, excepto la parte frontal, está construido con chapas laterales al igual que el tejado. La parte frontal está cerrada con una telera o valla de acero por donde se accede. El suelo es de cemento de fácil limpieza. Se dispone de tres bebederos y tres comederos.

El notificador deberá **aplicar las mejoras propuestas por la CNB** con el fin de reforzar las medidas de seguridad. En concreto:

- Cerramiento de la parcela de 200 metros cuadrados, subiendo el cerco existente hasta dos metros de altura y colocando una alambarrera para dificultar la entrada de animales y/o personas.
- Colocación, en el frontal del cobertizo, de una chapa de un metro de altura. De esta forma se pretende evitar la salida de paja o heces del mismo a la parcela.
- Cerramiento de todo el cobertizo con malla para evitar la entrada de aves silvestres u otros animales.
- Colocación de cerrojos de seguridad para evitar el acceso a personal no autorizado.

Identificación y caracterización de riesgos potenciales:

a) Caracterización molecular:

La caracterización genética de esta cepa SO2 está bien descrita y ha sido publicada en diversas revistas científicas. Las características de la construcción fueron confirmadas por PCR.

b) Capacidad de transferencia del material genético:

Mycobacterium tuberculosis tiene una distribución mundial, con especial incidencia en países en desarrollo donde las condiciones higiénico-sanitarias son deficientes. El hábitat natural son los individuos con tuberculosis aunque también se ha aislado de especies animales como el ganado bovino y el caprino. No existe conocimiento de que exista transferencia de material genético con otros organismos.

c) Estabilidad genética y fenotípica:

La mutación en *phoP* confiere atenuación de la virulencia de la cepa original de *M. tuberculosis*. No se ha producido reversión de la misma, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. Después de 6 meses de pases sucesivos en medio de cultivo, y en ratones inmunodeprimidos SCID, la cepa ha demostrado ser estable.



d) Patogenicidad:

El organismo *M. tuberculosis* se clasifica en el grupo de riesgo 3 según Real Decreto 664/1997, pero el OMG es una cepa atenuada SO2 de *Mycobacterium tuberculosis* debido a la mutación en el gen *phoP* siendo éste un gen esencial en la virulencia de esta bacteria. Su ausencia reduce la multiplicación de la bacteria en los macrófagos de ratón tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se ha demostrado en ratones inmunodeprimidos SCID (Martin, C. *et al.*, 2006) que presenta mayor atenuación que la cepa parental y que la BCG (única vacuna disponible para la prevención de tuberculosis en humanos).

Se demostró, así mismo, que la cepa atenuada SO2 de *M. tuberculosis* comparada con la BCG, mejoró la supervivencia de cobayas, redujo la severidad de la enfermedad en el pulmón y la diseminación de la infección en el bazo.

Por otro lado, en otros estudios se analizó el efecto de la mutación *phoP* observándose también cambios en la morfología, la tasa de crecimiento y la virulencia de la cepa *in vitro* e *in vivo*.

e) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

Las micobacterias son organismos aerobios estrictos, resistentes a la desecación y la congelación aunque relativamente sensibles al calor y la luz solar. No poseen forma esporulada aunque las características de su pared les confiere cierta resistencia. Además, las micobacterias causantes de tuberculosis en el hombre y los animales son de crecimiento lento. La transmisión de la bacteria sólo puede realizarse a partir de hospedadores que tengan una infección activa. La infección se produce al inhalar gotas microscópicas (gotas Flügge) que contienen la bacteria.

En cuanto a su posible diseminación en el medio ambiente, se ha comprobado una baja persistencia de este organismo modificado fuera de las condiciones de cultivo, además de ser un organismo atenuado y por tanto de menor virulencia.

Por otro lado, y con objeto de evaluar la excreción de la cepa vacunal tras la vacunación, se ha llevado a cabo **un estudio de biodistribución** con este OMG en ganado caprino doméstico para determinar su posible excreción por heces u orina en las horas posteriores a su administración, así como su persistencia en los tejidos.

En el ensayo se emplearon cuatro cabras macho menores de un año de edad, procedentes de rebaños libres de tuberculosis. Los animales se vacunaron empleando una dosis 100 veces superior a la recomendada inicialmente. Se sacrificaron dos animales transcurridas 24 horas desde la aplicación de la vacuna, otros dos animales 48 horas después y, en ambos casos, se realizó necropsia de distintos órganos y fluidos biológicos (linfonodos, heces y orina).

Tras analizar las muestras no se identificó ADN de esta cepa vacunal mediante PCR en heces y orina en ninguna de las muestras analizadas. Además, hasta la fecha, el cultivo bacteriológico es negativo, aunque se mantendrá en incubación hasta 3 meses antes de considerarlo definitivamente negativo. Cumplidos los tres meses **se deberán presentar a la CNB los resultados de estos análisis.**



f) Resistencia a los antibióticos y uso potencial de dichos antibióticos en seres humanos y animales domésticos con fines profilácticos y terapéuticos:

En el caso de la cepa parental (*M. tuberculosis*) el tratamiento en seres humanos se basa en la combinación de distintos fármacos: isoniazida (INH), rifampicina (RIF) y pirazinamida durante los dos primeros meses; e INH y RIF hasta completar los 6 meses de tratamiento (World Health Organization, 2010). En el caso de pacientes con tinciones de esputo positivas, tuberculosis pulmonar diseminada, antecedentes de contacto con un paciente con tuberculosis resistente conocida y/o pacientes coinfectados con VIH, también se administra un cuarto fármaco llamado etambutol (EMB) o en algunos casos la estreptomina (STR). En los animales no está permitido ningún tipo de tratamiento, en el caso de los animales de compañía se recomienda el sacrificio de los mismos.

g) Control y tratamiento de residuos:

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera en general adecuadas las medidas propuestas por la empresa para llevar a cabo el control post-liberación de la zona:

Programa de actuación, control y vigilancia del OMG:

- En cuanto al Protocolo de entrada y salida de la granja, solo dispondrán de la llave de la parcela la persona que realiza el cuidado de los animales de la UCM y el investigador responsable de la prueba de VISAVET. Al entrar al cobertizo se pondrán el mono, las calzas y los guantes (mascarilla únicamente los días de extracción de sangre, vacunación e infección). A la salida del cobertizo, se quitarán las calzas en la puerta del cobertizo, después el mono, la mascarilla y los guantes y se depositarán en una el contenedor de residuos que se cerrará llevará al Centro VISAVET para su adecuada gestión.
- Se realizará un control diario por el personal cuidador de los animales (horario laboral de lunes a viernes de 9-17 horas, registro de vigilancia y cuidado de los animales e incidencias en su caso), por el personal investigador (personal veterinario, registro de bienestar de los animales e incidencias) y por la Unidad de Control y Seguridad de la UCM, que serán avisados de la realización de la experiencia; número de animales, localización, para vigilancia también en festivos y fines de semana. Disponen de los teléfonos de personal responsable de VISAVET para poder comunicar cualquier incidencia.

Además, se llevará a cabo (tal como propone el notificador) una toma de muestras periódica de los residuos (heces, paja del suelo) para determinar la presencia o ausencia del OMG. Al inicio de la prueba se realizarán de forma semanal, y si los tres primeros resultados son negativos se alargarán en el tiempo tomándose cada 15 días. También se realizará un control exhaustivo de vectores invertebrados, insectos, y vertebrados, pájaros y roedores, que son los que más pueden intervenir en la propagación potencial de la bacteria, junto con una desinfección eficaz periódica de las instalaciones.



Gestión de residuos: Se hará una limpieza semanal mediante pala del suelo del cobertizo y su eliminación se llevará a cabo en contenedores de biosanitarios que serán retirados por la empresa autorizada FCC medioambiental. Estos contenedores se llenarán hasta $\frac{3}{4}$ de su capacidad y se trasladarán a VISAVET en la excavadora para su almacén en las sala de residuos del Centro hasta su retirada.

Las muestras tomadas a los animales para análisis se dispondrán en contenedores estancos en la granja trasladándose por el personal investigador hasta VISAVET, extremando las medidas de precaución para evitar un posible vertido accidental en el transporte de las mismas. Los animales, una vez eutanasiados, se trasladaran al laboratorio seguridad biológica de nivel 3 de VISAVET en doble bolsa de galga gruesa para la realización de la necropsia.

La eliminación de cadáveres y de los residuos generados durante el estudio se llevará a cabo en contenedores específicos para residuos biosanitarios. La gestión de los contenedores la realiza la empresa autorizada contratada para tal fin por la UCM.

Las jeringas, sistemas vacutainer, agujas, hisopos, etc., se depositarán en contenedores de punzantes. Una vez llenos se introducirán en los contenedores de biosanitarios para su retirada. Los Equipos de Protección Individual, como mascarillas, guantes, monos impermeables de un solo uso y calzas, se retiran también en estos contenedores para su posterior eliminación.

h) Planes de acción en caso de emergencia:

Están previstos planes de descontaminación en caso de ser necesarios: tratamiento de personas habitual para la tuberculosis y sacrificio de animales en su caso, descontaminación del lugar (zotal o derivados del cloruro de didecildimetilamonio o del glutaraldehido) y vigilancia de la salud para personal expuesto a tuberculosis (prueba Mantoux, análisis de sangre, etc.).

Cualquier incidencia o situación de emergencia deberá ser comunicada inmediatamente a la Autoridad competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad.

CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de uso propuestas, el ensayo no supone un riesgo significativo para la salud humana y/o el medio ambiente.

Una vez concluido el ensayo se remitirá un **informe de resultados** del mismo a la Comisión Nacional de Bioseguridad. En dicho informe se deberá incluir información sobre las posibles incidencias, si las hubiera. La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid, a 24 de abril de 2012