



EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE *BRUCELLA MELITENSIS* MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/19/14)

Título del ensayo

Ampliación de los ensayos para el estudio de inocuidad, excreción e infección del candidato vacunal BGV1 de *Brucella melitensis* en ganado ovino.

Objetivo del ensayo

El objetivo de la liberación es la evaluación de la cepa BGV1 de *Brucella melitensis* en ganado ovino para obtener una cepa viva más atenuada que Rev1, e igual o más efectiva frente a *Brucella melitensis*. Este organismo modificado genéticamente (OMG) está clasificado de riesgo tipo 2.

Antecedentes

Con fecha 05/06/2019 se presentó la notificación B/ES/19/14, correspondiente a un ensayo de liberación voluntaria en una granja experimental en Rascafría, inicialmente propuesto con dos candidatos vacunales de *Brucella melitensis* (cepas BGV1 y BGV2) modificadas genéticamente, en ganado ovino y que comprende 3 estudios adicionales (**ampliación de las notificaciones A/ES/18/81 y B/ES/18/31**), del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (VISAVET-UCM).

La notificación B/ES/19/14 se revisó en las reuniones 142ª y 143ª de la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB), celebradas el 10 de julio y 25 de septiembre de 2019, respectivamente. Tras la 142ª reunión, los miembros de la CNB acordaron requerir al solicitante información adicional en relación con las medidas a adoptar para evitar riesgos para el personal y para el medio ambiente en el caso de producirse abortos en las hembras gestantes y sobre el transporte de los animales ya vacunados desde la granja de Rascafría hasta el VISAVET. El notificador contestó a estas cuestiones con fecha 30/07/2019.

Adicionalmente, el 18/09/2019 el notificador comunicó la **cancelación de los ensayos con la cepa vacunal BGV2** por haberse detectado excreción de la bacteria en placenta, leche y ganglio mamario de ovejas preñadas durante el ensayo en el laboratorio de contención biológica de tipo 3. La cepa BGV1 no se excretó en ningún caso.

Por tanto, finalmente los tres ensayos propuestos son los siguientes:

- 1) Estudio E (notificación A/ES/18/81, autorizado en confinamiento de tipo 3 pero que no llegó a realizarse): con el objeto de analizar la eficacia de la vacuna, se propone realizar la primera parte en la Finca experimental de Rascafría, vacunando a ovejas de entre 8 y 10 meses de edad con la cepa vacunal BGV1, donde permanecerán hasta el día 60-65 de gestación, a partir del cual se trasladarán a los laboratorios de nivel 3 de bioseguridad del VISAVET para ser desafiadas a mitad de gestación (día 75 de gestación) para comprobar eficacia. Las ovejas permanecerán hasta final de gestación (parto o aborto) y serán sacrificadas antes de 4 semanas post-parto, para la obtención de muestras y realización de estudios bacteriológicos e inmunológicos. 15 animales/grupo.



- 2) Estudio seminuevo, igual que el de corderos propuesto bajo la notificación B/ES/18/31 (solo vacunación de 6 animales para comprobar respuesta inmune) únicamente con BGV1 marcada con una proteína fluorescente para poder diferenciar animales vacunados de animales infectados en el futuro (i.e. cepa portadora del gen *gfp* integrado establemente en el genoma de BGV1 para la producción constitutiva de una Green Fluorescent Protein o GFP).
- 3) Realizar el estudio C (según solicitud B/ES/18/31): Estudio de inocuidad, excreción vaginal o por leche, infección placentaria o fetal y respuesta inmune tras la vacunación con BGV1 en ovejas gestantes. En los resultados de excreción del primer estudio realizado en confinamiento, se comprobó que BGV1 y BGV2 no se excretaba durante la gestación por ninguna de las vías analizadas (especialmente, vagina, leche ni placenta) ni se transmitía a los corderos. Sin embargo la cepa BGV2 se ha detectado en placenta, leche y ganglio mamario de algunos animales, exclusivamente unos días después del parto. Por ello, el estudio de seguridad en gestantes con BGV1 se solicita realizarlo en Rascafría en su totalidad ya que para el grupo BGV1 no ocurrió nada de esto.

Periodo de liberación:

Características del organismo modificado genéticamente (OMG)

La cepa vacunal altamente atenuada BGV1, fue obtenida de *B. melitensis* Rev1, con delección en el gen *wzm* (Rev1 Δ wzm). Se trata de un OMG estable indefinidamente, obtenida por un método de doble recombinación homóloga denominado PCR *overlapping* consiguiendo la delección de genes de la región de interés de Rev1 (Conde-Álvarez et al. 2006). Este método permite la obtención de mutantes no polares y carentes de resistencias a antibióticos.

- a) **Organismo receptor:** La cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 (organismo receptor de BGV1) está aceptada y recomendada por la UE para su uso común como vacuna frente a la brucelosis en ganado ovino y caprino en condiciones de campo (O.I.E, 2012., Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis Ovina y Caprina 2015-2016 presentado por el MAPA; RASVE 2015). Una dosis alta de este microorganismo vivo puede ser patógena para seres humanos. En el caso de los animales (principalmente rumiantes), Rev1 sólo es patógena si se aplica en hembras gestantes, durante la primera mitad de la gestación, ya que en estos casos puede inducir el aborto. En condiciones fisiológicas normales, la vacuna no resulta patógena para estos animales, ya sean machos o hembras.
- b) **Organismo donante:** *Brucella melitensis*, cepa vacunal *B. melitensis* Rev1.
- c) **Inserto:** material genético obtenido del organismo donante, gen *wzm*, situado en la región genética *wbk* de *Brucella*. Este gen de interés codifica la proteína Wzm implicada en el transporte de la cadena O del LPS desde el citoplasma para su posterior ensamblaje al Core - Lípido A y formación del lipopolisacárido liso (LPS-S). Por lo tanto, la delección del gen en *Brucella* spp conlleva la generación de un OMG desprovisto de LPS-S. La ausencia de LPS-S tiene una función clave y conocida en la virulencia de *B. melitensis* por lo que dicho mutante en *wzm* está altamente atenuado. Los insertos no poseen elementos estructurales ya que los únicos genes incluidos en él están delecionados, ni poseen elementos reguladores o secuencias cuya función sea desconocida.
- d) **Vector:** es un plásmido derivado del vector pJQK (también llamado pJQKm), que no puede replicarse (plásmido suicida) en *Brucella melitensis*, lo que lleva a su extinción. En este vector se ha clonado el ORF de *wzm* delecionado obteniéndose el plásmido pJQK Δ wzm.



La delección de genes de la región de interés de Rev1 se ha realizado por un método de doble recombinación homóloga denominado PCR *overlapping* que permite la obtención de mutantes no polares y carentes de resistencias antibióticas. Esta cepa Rev1 utilizada como parental de BGV1, no posee resistencias antibióticas adicionales a las naturales de esta cepa.

- e) OMG resultante: BGV1: *Brucella melitensis* Rev1 con delección en el gen *wzm* (Rev1 Δ wzm).

Instalación

Estos estudios se realizarán así mismo en la granja experimental, Finca la Dominguita, en Rascafría, Madrid. Esta finca tienen un cierre perimetral completo, con control de entrada y señalización del acceso restringido. Los ensayos se realizarán una nave de 1.500 m² cuya apertura es mediante llave.

Las características de la instalación así como los métodos y procedimientos propuestos para evitar o reducir al mínimo la propagación de los OMG más allá del lugar de liberación, así como los requisitos de transporte entre el VISAVET y la finca experimental, están detallados en los informes de evaluación del riesgo de las notificaciones B/ES/18/31 (1ª y 2ª parte).

Evaluación del riesgo para la salud y el medio ambiente

1. Probabilidad de que el organismo modificado genéticamente se convierta en persistente e invasor en hábitats naturales en las condiciones de liberación(es) propuesta(s).

Estos OMG no se multiplican en ambientes naturales (aparte de dentro de sus huéspedes), por lo que debido a la actividad que se va a desarrollar con la cepa BGV1 atenuada, que consiste en vacunar ovinos en una granja controlada, no es probable que se convierta en persistente e invasor ya que los hospedadores son ovino y caprino y el hombre solo en caso de accidente.

En el Laboratorio de Brucelosis del Instituto de Agrobiotecnología se ha comprobado que Rev1 Δ wzm (BGV1) es altamente sensible a la desecación y a los detergentes. Además, es susceptible a la estreptomycin (a diferencia de Rev1), la penicilina y otros antimicrobianos. Por otra lado, es extremadamente susceptible a los factores solubles del sistema inmune innato, habiéndose observado inhibición completa del OMG a una concentración $\geq 0,18$ mg/mL de Polimixina B, mientras que la cepa de Rev1 (BGV1) parental resiste hasta 3 mg/mL. También se ha observado que BGV1 es mucho más sensible que su parental Rev al suero convencional ovino y bovino, completo y descomplementado. Se ha obtenido por mutagénesis mediante recombinación homóloga que origina la eliminación del gen de interés y la inserción del mismo gen delecionado, sin inserción de material genético adicional y realizado estudios de estabilidad tras múltiples pases consecutivos *in vitro* en medios de cultivo e *in vivo* en ratones y mediante aislamiento de tejidos a distintos intervalos post-inoculación. En todos los casos, el OMG ha mantenido sus características genotípicas y fenotípicas.

2. Patogenicidad y/o atenuación de la virulencia

El lipopolisacárido liso (LPS-S) es un conocido factor de virulencia de *Brucella* (Moriyón, Grilló et al., 2003). Todos los mutantes rugosos (con LPS-R) presentan una importante atenuación tanto en el



modelo murino de infección esplénica, ampliamente utilizado en brucelosis experimental (González, Grilló et al., 2008), como en corderos de 3-4 meses de edad (Barrio, Grilló et al., 2009).

Con los 7 mutantes rugosos de *B. melitensis* analizados en estas publicaciones, se estableció una relación directa entre la persistencia en los bazos de ratones y la persistencia en el ganglio diana de la vacunación subcutánea (ganglio escapular) en corderos (Barrio, Grilló et al. 2009).

BGV1 se ha construido mediante un sistema de mutagénesis por delección en fase que genera una delección irreversible del gen *wzm*, como se ha comprobado tras subcultivos seriados y a partir de órganos de animales vacunados (patente europea EP17382798.1.; Zabalza-Baranguá A., 2017).

En el modelo de infección esplénica en ratones (Grilló et al., 2012), BGV1 precisa mayor dosis que las cepas lisas (incluida la cepa vacunal Rev1) para producir infección. Tras lograr la infección, BGV1 está mucho más atenuado, desapareciendo de todos los bazos antes de 4 semanas postvacunación.

Además, BGV1 se ha estudiado en un modelo de ratona gestante puesto a punto en el IdAB, a partir de datos previos con cepas lisas virulentas (Grilló et al., 2012). Como resultado, se ha comprobado que este OMG es incapaz de producir infección ni lesiones histológicas en placenta o fetos, mientras que Rev1 induce altos niveles de infección placentaria (≈ 7 logs), incluso inoculando dosis 10 veces superiores de los OMG. Además, BGV1 permite el nacimiento de todos los embriones sanos, mientras que las cepas virulentas de *B. melitensis* inducen una elevada tasa de mortalidad intrauterina y reabsorción fetal.

Se han realizado estudios de seguridad y respuesta inmune en corderos de 3-4 meses de edad vacunados con BGV1::gfp (i.e. los OMG BGV1 marcado con *gfp* para la identificación de los animales vacunados mediante un ELISA-GFP descrito en Zabalza-Baranguá et al., 2018), en las instalaciones del CITA de Aragón. Estos animales no presentaron ningún síntoma de enfermedad ni abscesos que pudieran liberar los OMG al medio ambiente.

La menor persistencia de la respuesta inmune generada por BGV1::gfp en corderos de 3-4 meses de edad, podría ser un indicativo de la escasa persistencia de los OMG en estos animales, con la consiguiente mínima probabilidad (si alguna) de excreción en animales pre-púberes.

Los resultados en ratones y corderos indican que BGV1 tiene menor capacidad de infección (por precisar dosis de infección más altas) y menor capacidad de persistencia *in vivo* que otras cepas de *B. melitensis* en ratones. Con estos datos, podría esperarse un comportamiento similar de en otros seres vivos.

No existen evidencias de que la cepa BGV1 sea infectiva o patógena para los seres humanos. De hecho, ninguna de las 10 personas (investigadores y personal de campo) implicadas en los estudios con Bm16MRwzm y otros 6 OMG rugosos de *B. melitensis* (González, Grilló et al., 2008; Barrio, Grilló et al., 2009) en corderos de 3-4 meses de edad resultó infectada. Así mismo, ninguna persona se infectó tras la vacunación de corderos jóvenes (n=14) con BGV1::gfp (Zabalza-Baranguá, 2017).

3. Datos de biodistribución de los OMG en órganos y fluidos biológicos (vaginales, orina, heces, etc.)

En ratonas gestantes, se ha observado ausencia de excreción de BGV1 en fluidos vaginales, en contraste con otras cepas de *B. melitensis* (datos del IdAB no publicados).



En corderos de 3-4 meses de edad, la infección por Rev1 se limita al sistema linfoide (Barrio et al, 2009).

No se ha detectado excreción en fluidos biológicos de Rev1 (Muñoz et al., 2011), Bm16MRwzm (Barrio, Grilló et al., 2009) y BGV1::gfp (datos no publicados). Además, la ausencia de infección en órganos reproductores es coherente con la ausencia de excreción de *Brucella* en estos corderos y corderas pre-púberes.

4. Datos de supervivencia y posible transmisión

La capacidad de supervivencia y transmisión de la cepa BGV1 puede considerarse muy reducida o nula, debido a que:

- i) posee una delección irreversible en *wzm*, demostrando ser genéticamente estables tras subcultivos *in vitro* y tras la infección en ratones;
- ii) son sensibles al suero normal ovino y bovino y a la Polimixina B;
- iii) son altamente susceptibles a factores ambientales como:
 - Temperatura: al igual que Rev1 y en contraste con otras *B. melitensis* (Bossery et al., 1992), BGV1 no se multiplica a temperaturas del ambiente $\leq 20^{\circ}\text{C}$ ni a la temperatura corporal ovina 40°C ,
 - Deseccación y luz UV. BGV1 es susceptible a la desecación, especialmente en presencia de UV del sol directo;
 - Detergentes como 0,1% de tritón;
 - pH ácido;
 - estrés oxidativo.
- iv) son susceptibles a estreptomycin (antibiótico de elección para tratamiento de la brucelosis humana) en las condiciones en que Rev1 es resistente;
- v) se precisan altas dosis para generar infección tanto en ratones como en hospedadores naturales (Moriyón, Grilló et al., 2004); por lo que a priori cabe esperar que este OMG también sea más seguro para infectar al ser humano; y
- vi) no infecta placentas ni fetos y no se excreta en fluidos vaginales en modelo murino, en contraste con las cepas virulentas y con la cepa vacunal Rev1, incluso inoculando dosis elevadas de los OMG.

5. Posibles efectos inmediatos y/o diferidos sobre la salud humana a consecuencia de las interacciones potenciales directas e indirectas entre los OMG y las personas que trabajan con ellos, están en contacto con ellos o cerca de la(s) liberación(es) de OMG.

En cuanto a la salud humana, y teniendo en cuenta el Protocolo de Bioseguridad para la vacunación propuesto, es improbable que se produzcan efectos adversos por las medidas de protección que se establecerán en cuanto al personal investigador participante (uso de EPI desechables), siendo el principal riesgo una posible infección del personal por inoculación accidental.



El personal investigador que ha participado en la obtención de estos OMG tiene amplia experiencia en técnicas microbiológicas de *Brucella* y ha recibido formación específica para el trabajo con patógenos y OMG de niveles de bioseguridad 2 y 3.

Además, tienen la autorización oficial necesaria para realizar funciones de experimentación animal de acuerdo con las categorías contempladas en el Real Decreto 53/2013.

Se podría producir un accidente por inoculación accidental con jeringas o cortes con material contaminados con el microorganismo, por derrame o aerosoles que entren en contacto directo con conjuntivas o mucosas en el caso de excretarse estos OMG. No obstante, al haberse observado en los estudios previos en corderos prepúberes que la infección se limita al sistema linfoide, no es de esperar que el OMG se elimine a través de los fluidos biológicos.

No obstante en caso de accidente se tratará a los afectados con el antibiótico recomendado por la OMS para el tratamiento de la brucelosis habiéndose visto que BGV1 es más susceptible que Rev1 y otras brucelas a diversos antibióticos, especialmente a los recomendados para el tratamiento de la brucelosis humana, incluida la estreptomycinina (Rev1 es resistente).

Tratamiento de Residuos

La retirada de heces y paja se realiza previo empapado en ZOTAL o similar, de forma que al recogerlo es una masa que no crea polvo. En el caso de los ovinos, las camas de paja o similar permiten no tener que realizar limpieza hasta los tres o cuatro meses al tratarse de residuos secos. No hay purines ni lixiviados.

La gestión habitual de estos residuos en la granja es almacenar el estiércol en el corral externo, situado en un lateral del corral externo anexo al corral 3, cerrado con muro y solera de hormigón y puertas con cierre. Compostaje mínimo de 4 meses.

En este caso, se hará de la misma forma, recogiendo el estiércol para su almacén y compostaje, cada 3 meses aproximadamente, y al finalizar cada estudio.

Los cadáveres de los animales vacunados se consideran como Residuos SANDACH categoría I, y serán retirados por una empresa autorizada.

Se realizará muestreos ambientales semanalmente tomando estiércol de tres puntos por cada 12-14 metros cuadrados de corral, y analizándose con RT-PCR así como con cultivo en medios selectivos para detección/recuperación de los mutantes de BGV1 objeto de estudio.

En el caso, de que se obtuvieran resultados no esperados en este sentido, se tomarán las siguientes acciones:

- Sacrificio humanitario adelantado de los animales.
- Tratamiento del estiércol (paja, heces, orina, etc.) en el propio corral con cal, regando y dejando que actúe un mínimo de 24 horas, tomándose muestra para cultivo con el objeto de validar la desinfección, antes de su retirada y eliminación. Después se realizará compostaje de 8 meses.

Protocolo Normalizado de Trabajo: se trabajará de acuerdo con el protocolo de bioseguridad del empleado que se ha adjuntado, y que se ha revisado con respecto al primer estudio de liberación realizado con corderos en la granja Rascafría. Incluye los procedimientos a seguir en caso de



producirse aborto. El personal participante, previamente al inicio del estudio, es entrenado en el uso de los equipos, así como en el protocolo de actuación, de forma que se les autoriza firmando el procedimiento, que se encuentra *in situ* para su consulta en cualquier momento.

Transporte: la CNB solicitó al notificador información adicional en relación con el transporte de los animales ya vacunados desde la granja de Rascafría hasta el VISAVET (cumplimiento de requisitos normativos de bienestar animal, documentación de acompañamiento durante el transporte, medidas de precaución para evitar riesgos de diseminación accidental de los OMG, limpieza y desinfección del vehículo, etc.). Se envió un ejemplo de certificado sanitario de movimiento de animales resultado de la solicitud de traslado que tienen que realizar a la Comunidad de Madrid, en cumplimiento de la normativa, que incluye los datos del transportista con el que se trabaja habitualmente y que cumple con lo estipulado en relación al lavado y desinfección del vehículo.

CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de uso propuestas, **los tres estudios propuestos para este ensayo de liberación voluntaria no suponen un riesgo significativo para la salud humana, la salud animal y/o el medio ambiente.**

En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Autoridad competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad.

Una vez concluido el ensayo, se remitirá un informe de resultados de los mismos al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad. En este 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 26 de septiembre de 2019