



## EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE HERPESVIRUS DE PAVO MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/21/11)

### Título del ensayo

Vacunación de pollos con una vacuna de herpesvirus de pavo incluyendo el gen VP2 del virus de la enfermedad de la bursitis infecciosa. (B911C-ES-20-D54), del promotor Zoetis Spain, SL.

### Características del ensayo

La vacunación se realizará en la planta de incubación mediante aplicación *in ovo*. La vacuna se administrará a los huevos a los 18-19 días de embrionación utilizando equipos automáticos disponibles en el mercado (Embrex® Inovoject®). Se realizará una única dosis con aproximadamente 4.000 – 7.000 PFU/ds.

Se vacunarán aproximadamente 115.000 huevos de broilers. Tras la vacunación, las aves se trasladarán a la granja de broilers hasta el final de la cría (11-12 semanas).

### Organismo modificado genéticamente

El OMG, HVT-IBD #9, consiste en una cepa de Herpesvirus del pavo (HVT) cepa FC-126 que ha sido modificada genéticamente insertando el gen VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV).

### Organismo receptor

Cepa HVT “FC#126” o cepa HVT “FC-126. *Meleagrid herpesvirus 1*, herpesvirus del pavo. Virus de la enfermedad de Marek (MDV), es un virus de ADN envuelto.

Esta cepa se ha utilizado en tres vacunas registradas Poulvac Marek HVT CA, Poulvac Marek HVT Lyo y Poulvac Marek CVI+HVT.

### Organismo donante

Virus de la Enfermedad Bursal Infecciosa (IBDV) cepa Faragher 52-70.

El virus de la bursitis infecciosa está distribuido por todo el mundo en las aves domésticas, incluidos los pollos y los pavos, y también se ha aislado en aves silvestres. Hay algunas pruebas de que las aves silvestres transmiten el virus a las manadas domésticas y también pueden servir de reservorio.

VP2 es la única proteína que conforma la cápside de IBDV y es considerada como el principal inductor de la inmunidad protectora en el hospedador ya que contiene los epítomos antigénicos responsables de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes.

### Modificación genética

El gen que codifica la proteína VP2 del IBDV se inserta entre el UL55 (HVT065) y el gen 3 (HVT066) del genoma del HVT. No hay elementos reguladores conocidos en las regiones a uno y otro lado del sitio de inserción.

La vacuna recombinante se generó mediante transfección en un cultivo de células de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) derivadas de embriones libres de patógenos específicos (SPF) infectados con HVT que se cotransfectaron con el plásmido de transferencia que contiene un gen marcador flanqueado por secuencias HVT.



A continuación, se utilizó el plásmido de transferencia que contienen el gen que codifica la proteína VP2 de IBD flanqueado por secuencias de HVT, para sustituir el gen marcador. La casete VP2 del IBDV contiene un promotor del CMV humano, el gen VP2 (secuencia de ADN optimizada para la expresión en células aviares) y una secuencia poli A de la hormona de crecimiento bovina.

Se confirmó que el OMG, "HVT-IBD #9", expresaba los genes VP2 y HVT del IBDV mediante tinción de inmunofluorescencia dual, con anticuerpos específicos contra el IBDV y el HVT, y mediante PCR, utilizando cebadores para la región aguas arriba del VP2 del IBDV y cebadores inversos situados dentro de la región codificante del VP2 del IBDV. La expresión y traducción exitosa de VP2 se confirmó además mediante un análisis de Western Blot. Por último, se llevó a cabo la secuenciación del ADN del inserto y de los sitios HVT flanqueantes.

### **Evaluación del riesgo para la salud humana, animal y el medio ambiente**

#### **-Patogenicidad**

Se sabe que HVT no es patógeno y durante más de 40 años se ha utilizado ampliamente como una vacuna eficaz para el control de la enfermedad de Marek de los pollos sin efectos adversos para la salud pública. La cepa HVT se replica exclusivamente en células de origen aviar (particularmente de pollo, pavo, pato y codorniz) y los intentos de infectar células de mamíferos han fracasado repetidamente.

En las aves expuestas, HVT inicialmente infectan y se replican dentro de los linfocitos, donde el virus permanece asociado a las células. Después de unos siete días, aunque los linfocitos siguen albergando el genoma viral, la infección se vuelve latente y la expresión del antígeno viral en estos disminuye. Tras la infección de los linfocitos, la infección productiva, que produce un virus infeccioso maduro libre de células en las células del epitelio del folículo de la pluma, comienza tras aproximadamente una semana o más.

En los estudios de reversión de la virulencia, se demostró que cinco pases en serie de HV T-IBD #9 eran seguros cuando se inoculaba *in ovo* en el 18 día de embrionación. Se administró a embriones SPF a una dosis aproximadamente tres veces superior a la esperada en el campo. A los 7-8 días después de la eclosión se sacrificaron los pollos y se aisló el virus en sangre y en leucocitos esplénicos. Las tasas de eclosión fueron  $\geq 83\%$  en los huevos vacunados y  $\geq 81\%$  en los no vacunados. La mortalidad fue del 0% en todos los grupos y no se observaron signos clínicos en ninguna de las aves relacionadas la enfermedad de Marek.

En un estudio de seguridad en animales diana con una sobredosis de 10 veces de HVT-IBD #9 administrada *in ovo* o por vía subcutánea a pollitos de un día de edad, la vacuna resultó ser segura. Las tasas de eclosión de los huevos no vacunados (95,9%) y de los huevos vacunados (96,0%) fueron similares. La mortalidad a los 120 días de edad fue del 1,67% en el grupo no vacunado, del 3,33% en el grupo vacunado, del 1,67% en el grupo vacunado por vía subcutánea y del 85% en el grupo no vacunado que fue desafiado con un virus virulento de la enfermedad de Marek para demostrar la susceptibilidad de los pollos a la enfermedad de Marek. Se encontraron lesiones de la enfermedad de Marek en el 93% de las aves desafiadas y en ninguna de las otras (no desafiadas). No se detectaron diferencias significativas en los pesos corporales medios de las aves vacunadas en comparación con las no vacunadas (no desafiadas) a los 120 días de edad.

La patogenicidad de la cepa vacunal HVT-IBD#9 se evaluó en estudios con animales no diana, pavos, codornices, faisanes y ratones. Durante los estudios no se observaron signos clínicos anormales,



incluida la muerte, ni lesiones atribuibles a la vacuna, lo que confirma la seguridad de la vacuna en especies no diana.

Los resultados de estos estudios confirmaron que la cepa vacunal HVT-IBD #9 tiene el mismo perfil de seguridad benigno que la cepa parental HVT y, por tanto, se considera que tiene una patogenicidad similar.

### **-Estabilidad**

La estabilidad se confirmó mediante el análisis de la secuencia de ADN del HVT-IBD#9. La estabilidad fenotípica se determinó mediante la coexpresión de los productos de los genes HVT e IBD detectados por el ensayo de inmunofluorescencia dual.

### **-Supervivencia, multiplicación y dispersión. Capacidad de colonización**

La posibilidad de que la cepa de la vacuna sobreviva, se multiplique y se disemine en el medio ambiente es baja, ya que las características moleculares y biológicas de la vacuna limitan su viabilidad fuera del huésped.

El OMG tiene las mismas características que la cepa parental HVT en relación a la inactivación y supervivencia. La capacidad del virus vacunal para sobrevivir extracelularmente en el medio ambiente está limitada por las condiciones ambientales que afectan a la viabilidad de la célula y que, por tanto, destruyen la envoltura viral formada por una bicapa de fosfolípidos que de la membrana nuclear de la célula huésped. En general, la envoltura es sensible a la desecación, el calor, la salinidad y los cambios de pH.

Los virus de la enfermedad de Marek de los serotipos 1 y 2 tienen la capacidad de replicarse en el epitelio del folículo de la pluma de las aves susceptibles al virus. Estos virus se replican y producen partículas virales infecciosas libres de células en las células epiteliales del folículo de las plumas. Estas células epiteliales se desprenden en forma de caspa al medio ambiente. Sin embargo, la replicación de HVT en el epitelio del folículo de la pluma es limitada y transitoria en los pollos.

La supervivencia intracelular del virus en la caspa y la cama y las plumas (presumiblemente unidas a restos celulares) de los pollos infectados es más larga que la supervivencia viral extracelular, pero puede ser inactivada por desinfectantes químicos en un periodo de tratamiento de 10 minutos. Sin embargo, no se produce la multiplicación del virus fuera del huésped. Dado que el virus vacunal no es patógeno para los mamíferos y las aves, no se esperan efectos adversos por la supervivencia y la dispersión en el medio ambiente.

Los estudios de seguridad con la vacuna parental HVT han demostrado que el virus HVT tiene un bajo nivel de supervivencia en las descamaciones de los pollos vacunados. En un estudio en pollos se recogió las descamaciones de estos en los días 11 y 21 de la ventilación de las jaulas de aislamiento con filtro HEPA que albergaban a las aves vacunadas. Para comprobar la supervivencia en el medio ambiente, los residuos recogidos el día 21 se analizaron mediante el aislamiento del virus infeccioso en cultivos CEF y mediante qPCR. La presencia viral para la cepa parental HVT se detectó el día 7 y 11 días después de la recogida, el día 21. Por lo tanto, si el HVT se localiza intracelularmente en, por ejemplo, las descamaciones, su supervivencia se prolonga varios días.

En un estudio separado de supervivencia ambiental se examinó la supervivencia de la cepa HVT en condiciones típicas de incubadora y se observó que permaneció viable hasta 8 horas a 30°C y a 25°C, aunque las cantidades medias fueron  $\leq 0,1$  PFU/0,05 ml. El virus parental HVT no fue detectable a ninguna de las dos temperaturas a las 24 horas y en todos los puntos de tiempo posteriores hasta 7 días



después del almacenamiento en condiciones de incubadora. Por lo tanto, el virus HVT asociado a las células tiene un tiempo de supervivencia muy limitado durante 8 horas en el medio ambiente si está presente extracelularmente.

En un estudio de diseminación y propagación en el que se utilizó HVT-IBD #9 y la cepa parental HVT, se demostró que la vacuna final era capaz de diseminarse a la sangre, el bazo, la bursa, el timo y la pulpa de las plumas de los pollos SPF, conservando así el mismo tropismo orgánico que la cepa parental. En otro estudio de diseminación y propagación en pollos utilizando HVT-IBD #9 y la cepa parental HVT, se demostró que la vacuna final se diseminó a través de la cloaca y los residuos de los pollos SPF, conservando así el mismo patrón de diseminación que la cepa parental. El contagio a aves ingenuas en contacto fue infrecuente (1 de 18 pollitos; 6%) y limitado, ya que no se observó ningún otro contagio de aves en contacto con ambas cepas. No se hallaron lesiones bursales macroscópicas ni signos de la enfermedad de Marek en ningún cadáver de las aves inoculadas.

El fino polvo de las plumas podría dispersarse dentro de una explotación avícola, y existe la posibilidad de que los individuos que trabajan en la explotación y otros animales presentes en la proximidad de las aves vacunadas estén expuestos al virus de la vacuna por inhalación, ingestión y contacto con superficies contaminadas. No se espera que la exposición de los seres humanos y otros mamíferos al virus de la vacuna HVT-IBD constituya un problema sanitario importante, ya que el virus de la vacuna no tiene potencial para multiplicarse en el medio ambiente y no es patógeno. No se ha logrado en condiciones de laboratorio infectar células de mamíferos con virus vacunales HVT y recombinantes HVT-IBD.

Para evitar la introducción de la enfermedad en las manadas, las incubadoras y las operaciones de cría intensiva en las que se utilizará la vacuna para este ensayo están situadas fuera de las zonas urbanas con grandes poblaciones humanas, y no están situadas cerca de zonas protegidas, zonas de sensibilidad ambiental o zonas de producción intensiva de otros animales destinados a la alimentación.

#### **-Capacidad de transmisión genética**

Los virus de la enfermedad de Marek (MDV), incluido el HVT, albergan secuencias genéticas homólogas a las encontradas en las especies aviares y, durante la latencia en los linfocitos infectados, se encuentran en forma episomal o se integran en los cromosomas del huésped. Esto podría facilitar los eventos de recombinación homóloga entre los virus de la enfermedad de Marek y el genoma aviar.

La cepa HVT se ha utilizado ampliamente para preparaciones de vacunas "convencionales" y vectoriales frente a la enfermedad de Marek y no hay pruebas de que se hayan producido eventos de recombinación entre vacunas HVT o vectoriales HVT. Por ejemplo, el HVT parental es un componente de vacunas bivalentes con otros virus vivos atenuados de la enfermedad de Marek (DM) (por ejemplo, Poulvac Marek CVI-HVT). Además, las prácticas de vacunación habituales en Europa y en Estados Unidos incluyen la mezcla de vacunas frente al HVT (serotipo 3), las cepas de MDV SB1 (serotipo 2) y Rispens (serotipo 1) y el IBDV (serotipo 1). Hasta la fecha, no se han notificado acontecimientos adversos causados por la aplicación simultánea de ninguna de estas vacunas. Del mismo modo, no hay informes de transferencia horizontal de genes entre los virus HVT y MDV (serotipo 1) en pollos o en especies no día, ni sobre la transferencia horizontal de genes entre los virus HVT y los virus vacunales virulentos o atenuados de tipo salvaje (serotipo 1) de la enfermedad de Marek en pollos o en especies no diana. Esto sugiere que, si la recombinación ocurre entre estos virus relacionados, tales eventos no están produciendo regularmente virus patógenos.



Se informó de un caso de recombinación producida experimentalmente del serotipo 2 del MDV con el serotipo 1 del MDV. Sin embargo, la homología a nivel de secuencia de nucleótidos entre el HVT y el MDV del serotipo 1 y el MDV del serotipo 2 es baja y explica por qué no se han observado eventos de recombinación entre estos virus. El intercambio de material genético entre las cepas HVT y MDV se ve dificultado además por un fenómeno llamado inhibición de la superinfección (la prevención de la infección de células ya infectadas por otras partículas virales de la misma especie viral). Debido a la inhibición de la superinfección, sólo hay un tiempo muy limitado (entre 1 y 4 horas) para que una célula se infecte con diferentes virus del herpes. Este fenómeno reduce considerablemente las posibilidades de transferencia de material genético.

La recombinación entre el OMG y el IBDV de tipo silvestre se considera improbable debido a las diferentes localizaciones y tipos de material genético, ya que el HVT es un virus de ADN y se replica en el núcleo celular y el IBDV es un virus de ARN que se replica en el citoplasma celular.

### **Manipulación, control y tratamiento de residuos**

La vacuna HVT-IBD se utilizará en una planta de incubación y los pollitos vacunados se transportarán a una granja de pollos de engorde, donde los pollos se mantendrán en condiciones de cría en el interior de la instalación, por lo que tendrán poca exposición directa al medio ambiente (vallado perimetral, rotaluvio y móchila de desinfección de ruedas, suministro de pienso por el exterior del vallado, pediluvio a la entrada de la nave, un registro de control de visitas por escrito y entrada prohibida a cualquier persona ajena a la granja o al personal de la cooperativa). En la incubadora, todos los visitantes deben firmar un libro de visitas, ducharse antes de entrar en la planta de incubación y llevar ropa limpia proporcionada por la planta de incubación. Sin embargo, puede producirse una liberación limitada del organismo de la vacuna cuando se limpien los gallineros o a través del aire ventilado.

En la planta de incubación los técnicos que manipulen y preparen la vacuna y conecten la bolsa de vacunas al dispositivo Embrex Inovoject, utilizarán bata, máscara protectora, guantes de nitrilo desechables y gafas de seguridad. Los trabajadores que manipulen el dispositivo Embrex Inovoject utilizarán guantes de nitrilo desechables y una máscara de protección.

Deben seguirse los procedimientos estándar de desinfección del personal y del equipo después de los procedimientos de vacunación. El personal que participe en el tratamiento de los pollos vacunados debe seguir los principios generales de higiene y tener especial cuidado al manipular la cama de los pollos recientemente vacunados.

Los métodos y procedimientos de tratamiento seguirán las prácticas ganaderas habituales de cada una de las explotaciones avícolas. No se necesitan métodos o procedimientos específicos para evitar la propagación, aparte de las prácticas de cría normales para cada una de las operaciones avícolas, debido a la capacidad de propagación muy limitada y a la naturaleza no patógena de la cepa parental o del OMG. Dado que la cepa de la vacuna está asociada a las células, se inactiva fácilmente utilizando los procedimientos estándar de limpieza y desinfección existentes.

Deberán seguirse los procedimientos estándar de limpieza y desinfección normalmente utilizados durante la producción comercial de aves de corral. Por lo general, esto incluirá el desdoblamiento completo de la nave, la retirada de toda la basura (ya que el virus asociado a las células no puede sobrevivir en la basura o el estiércol), el barrido exhaustivo del suelo, seguido de la limpieza del edificio con agua y jabón de arriba a abajo y dejándolo actuar durante 20 minutos antes de enjuagarlo.



A continuación, se desinfectará el edificio con glutaraldehído y amoníaco cuaternario. Cada tres meses se realiza una rotación de desinfectantes con un compuesto de peróxido de hidrógeno.

En la planta de incubación, los residuos de la sala de preparación de vacunas se depositan en dos contenedores distintos: uno para los residuos biológicos y otro para las sustancias químicas. Ambos contenedores están precintados e identificados por el color y por una pegatina en la tapa y el contenedor. Ambos contenedores son retirados dos veces al año, en mayo y noviembre, por la empresa encargada de la manipulación de este tipo de residuos.

Para los residuos de huevos (cáscaras y contenido de los huevos) dispondrán de un contenedor que se vacía 3 veces cada 2 semanas por una empresa externa (los residuos orgánicos se utilizan para producir gas para la generación de electricidad). El mismo procedimiento de eliminación de residuos se sigue en la sala de preparación de pollitos de un día para la eliminación de pollitos muertos y cáscaras.

Todas las aves muertas durante el ensayo serán recogidas por empresas especializadas en la extracción de grasas y serán conmutadas por subproductos animales.

La gallinaza la gestiona el propio ganadero en las tierras que tiene adjudicadas a la explotación como abono.

**En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB) y al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG).**

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

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 (CNB). 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 13 de mayo de 2021