



**EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE
BRUCELLA MELITENSIS MODIFICADA GENÉTICAMENTE DE TIPO 2, DEL
INSTITUTO DE GANADERÍA DE MONTAÑA (CSIC-ULE)
(Notificación B/ES/22/08)**

Título del ensayo

Estudio de una cepa vacunal atenuada de *Brucella melitensis* (Rev1Δwzm) modificada genéticamente en ganado ovino, del Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE).

La finalidad del ensayo de liberación es el estudio de respuesta inmune y eficacia vacunal del OMG, Rev1Δwzm, en ovejas. El período propuesto para la liberación es de abril a septiembre de 2022.

Antecedentes

Esta solicitud del Instituto de Ganadería de Montaña (IGM, CSIC-ULE) se recibió por Sede electrónica el día 25/02/2022.

El Comité de Bioseguridad del IGM, cuyo ámbito de actuación está limitado al citado Instituto, se centra en asesorar a su Dirección en cuantos aspectos conciernen al desarrollo de investigación con agentes biológicos (riesgos que éstos comportan o las medidas de contención y protección necesarias de acuerdo a la normativa vigente), con función evaluadora de los aspectos éticos y de bioseguridad de la investigación.

Además, en tanto que el Instituto de Ganadería de Montaña es un centro mixto de titularidad compartida entre el CSIC y la Universidad de León que carece de personalidad jurídica propia, toda la investigación que en él se desarrolle y que comporte la utilización de agentes biológicos de riesgo para seres humanos, animales, plantas y/o el medio ambiente, o la manipulación de material que los contenga, deberá ser favorablemente evaluada por el Comité de Ética del CSIC o bien por el de la Universidad de León, siempre con carácter previo a su inicio, independientemente del marco en el que se realice o de si se trata o no de una actividad financiada. Lo anteriormente manifestado no obsta el desenvolvimiento de las competencias institucionalmente asignadas al respecto al Área de Prevención de Riesgos Laborales y a la Unidad de Vigilancia de la Salud.

Esta notificación se estudió en la 163ª reunión de la CNB, donde se acordó pedir algunas aclaraciones al notificador en relación con el transporte de los animales, el modelo de desafío propuesto y la recogida de las aguas residuales. El IGM contestó el día 30/03/2022 y los miembros de la CNB consideraron adecuadas las respuestas.

Actividad

El estudio comprende dos etapas:

1. Vacunación de ovejas y estudio de la respuesta inmune generada, en las instalaciones del IGM (León).
2. Infección experimental a mitad de gestación con *B. melitensis* H38. En primer término, se preveía llevarlas a las instalaciones BSL3 de VISAVET-UCM (Madrid), sin embargo,



posteriormente se comunicó que, por falta de disponibilidad de boxes en esas instalaciones en las fechas necesarias, se buscará otra instalación que se comunicará cuando esté confirmado.

Por lo tanto, la finalidad de la liberación que se solicita en primer lugar en este ensayo, es el mantenimiento de ovejas de un año de edad no gestantes y sincronización de gestaciones (a las 4 semanas post-vacunación), en las condiciones habituales de la granja, hasta su transporte a otras instalaciones BSL3 en el día 60 de gestación, para realizar un desafío frente a *B. melitensis* en el día 75 de gestación.

El beneficio esperado de este estudio es comprobar si el OMG desarrollado, además de ser seguro e inmunogénico en ganado ovino, confiere protección frente a la infección virulenta en ganado ovino gestante (situación de máxima vulnerabilidad a la infección).

La duración total del estudio será de 16 semanas y se utilizarán un total de 48 ovejas de raza Ripollesa, con 18-20 meses de edad, procedentes del centro suministrador ANIMALIA (Gerona) libres de brucelosis (con pruebas serológicas oficiales frente a especies lisas y rugosas) y de otras enfermedades infecciosas con implicaciones reproductivas como Clamidia, *Toxoplasma*, *Coxiella burnetti*, *Salmonella abortusovis*, *Border disease* y *Maedi visna*.

El transporte se realizará en un camión climatizado y autorizado para el transporte de ganado ovino, previa emisión de la guía correspondiente por la autoridad competente, de acuerdo con la normativa vigente.

Se ha presentado el protocolo detallado del estudio desde el inicio del ensayo hasta su finalización.

Características del organismo modificado genéticamente (OMG)

Como norma general, las bacterias del género *Brucella*, excepto *B. ovis*, se consideran patógenos del grupo de riesgo 3 (R. D. 664/1997). Sin embargo, el OMG de este estudio ha sido obtenido a partir de la cepa vacunal Rev1, ampliamente utilizada en todo el mundo, desde 1960, para su uso común en condiciones de campo. Actualmente, sigue siendo la única vacuna recomendada para erradicar la brucelosis de los pequeños rumiantes (OIE, 2018. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*; Programa Nacional de Erradicación de la Brucelosis Ovina y Caprina 2015-2016 presentado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, MAPA-RASVE 2015).

El OMG es el mutante rugoso derivado de la cepa vacunal *Brucella melitensis* Rev1. Se ha realizado una delección irreversible del gen *wzm*, en la que los insertos (*wzm* truncado) se localizan en la ORF del gen *wzm*, sustituyendo al marco de lectura del gen *wzm* original.

Se considera que el OMG es estable, ya que se han llevado a cabo estudios de estabilidad después de múltiples pases en medios de cultivo y después del aislamiento de tejidos de ratón, en diferentes intervalos posteriores a la inoculación. En todos los casos el OMG ha mantenido sus características genotípicas y fenotípicas.

Desde 2018, se han realizado diversos estudios en España de seguridad y respuesta inmune en ganado ovino de distinta edad, sexo y momento de la gestación:

- 1) En las instalaciones de uso confinado de nivel 3 de contención (BSL3) de VISAVET-Universidad Complutense de Madrid (UCM), y de la empresa AM Animalia SL (Gerona) en condiciones de contención biológica de nivel 2 (BSL2) (Notificación A/ES/20/I-38).



- 2) Realización de una liberación voluntaria en la finca de la UCM en Rascafría (Madrid) (Notificación B/ES/18/31).

En todos los casos, los ensayos fueron autorizados por el CIOMG y la AEMPS (Ensayo Clínico Veterinario 432/ECV; y Producto en fase de Investigación Clínica Veterinaria 194/PIV, resolución del 23 de mayo de 2019).

En todos los estudios, el OMG mostró resultados favorables de seguridad y respuesta inmune, con ausencia de excreción por lágrimas, heces, orina, vagina ni semen, persistencia en ganglios linfáticos u órganos inferior a 8 semanas, y ausencia de transmisión vertical a fetos. Por ello, se indica que no se espera liberación del OMG al medio ambiente que, en cualquier caso, tendría una supervivencia muy limitada. Asimismo, ninguna de las personas implicadas directamente en los experimentos con el OMG padeció infección por el OMG; no obstante en dicho caso, la alta susceptibilidad antibiótica del OMG implicaría alta eficacia de los tratamientos convencionales.

Instalación

El ensayo se realizará en el Instituto de Ganadería de Montaña (IGM) situado en la Carretera León-Vega de Infanzones.

Se inoculará a animales experimentales alojados en recintos cerrados con acceso restringido (75m²), localizados en los 1.350 m² que tiene la Nave Experimental 1.

Se indica que no hay biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas en las proximidades que pudieran verse afectados. En el IGM se realizan diferentes estudios experimentales en pequeños rumiantes. Es probable que coincidan en el tiempo algunos de estos estudios y aquel que se pretende realizar con el OMG. Sin embargo, los animales de los diferentes estudios se encuentran aislados en alojamientos físicamente separados y con puertas de acceso controladas, lo que hace altamente improbable que los animales experimentales de un estudio entren en contacto directo con los de otro.

La duración prevista de las operaciones será la permanencia de los animales en la granja durante 3 meses desde el día de la vacunación.

Características de la instalación

Las instalaciones donde se llevará a cabo la liberación controlada de este OMG corresponden al alojamiento 2 de la nave experimental 1 del IGM (CSIC-ULE). Se presentaron fotos de todas las dependencias.

Dicha nave dispone de una superficie de 1.200 m² y está destinada al alojamiento de animales en procedimientos experimentales. Además de los vestuarios y servicios, cuenta con 9 recintos, 7 de ellos destinados al alojamiento de animales y 2 destinados a la sala de ordeño. Los vestuarios se encuentran separados de los recintos destinados al alojamiento de animales mediante dos puertas.

El alojamiento 2 está destinado para el alojamiento de pequeños rumiantes. La entrada a este recinto está separada del pasillo de acceso mediante un muro y una puerta de chapa galvanizada de 1,5 m de altura y de desplazamiento lateral. Tiene una superficie total aproximada de 100 m². En este recinto existe un sistema para el alojamiento de animales que permite diversas configuraciones, desde 1 a 4



boxes. Su construcción también es en acero galvanizado y de forma que puede desmontarse completamente tras la finalización del experimento, para su limpieza y desinfección.

Los suelos están contruidos con hormigón y son lisos, no deslizantes, impermeables, pudiéndose limpiar y desinfectar a fondo. Las paredes y los techos son resistentes, con superficies lisas, impermeables y fácilmente lavables. La ventilación es estática, en sentido horizontal a través de dos ventanas en su fachada oeste, dotadas de rejilla y el muro, donde se encuentra la puerta de acceso, tiene una altura de 1,5 metros, aproximadamente, lo que permite la circulación de aire por encima. Además, se cuenta con ventilación en el tejado de la nave.

Los boxes están provistos de bebederos automáticos y de comederos, fabricados con chapa galvanizada y adecuados para pequeños rumiantes. El número de animales que se alojan en cada box depende de su peso, cumpliendo siempre los requisitos de superficie (metros cuadrados/animal) y de longitud de comederos (metros/animal) para la alimentación ad libitum, conforme al R.D. 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Métodos y procedimientos para evitar o reducir al mínimo la propagación de los OMG más allá del lugar de liberación

Los animales se alojarán en una nave cerrada, con acceso restringido. El acceso a la finca del IGM también está restringido a personal autorizado.

Se dispone de pediluvio a la entrada y se realiza cambio de ropa de trabajo. Se propone así mismo, la gestión de las muestras, residuos, equipos de protección individual (EPI) no reutilizables para el personal.

Se realizará el seguimiento mediante toma de muestras semanales de sangre y fluidos vaginales; con limpieza y desinfección del área de muestreo y de los materiales de transporte de las muestras recogidas. Se realizará la limpieza y desinfección de todos los corrales tras finalizar la experiencia. La liberación finalizará con el transporte de los animales a las instalaciones donde se hará el desafío.

En caso de ser necesaria alguna necropsia por fuerza mayor, ésta se realizará habilitando una zona adecuada para su desinfección, en el interior de la nave cerrada donde se alojan los animales. Las canales se considerarán SANDACH tipo I.

El transporte de las muestras desde la granja hasta el laboratorio se realizará de acuerdo con la *Orientación sobre las regulaciones para el transporte de sustancias infecciosas 2017-2018* (OMS).

Información sobre el seguimiento

Se tomarán muestras semanalmente de secreciones vaginales y sangre, para seguimiento bacteriológico y serológico de los animales, durante todo el estudio.

En cuanto a los métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema, en los estudios realizados hasta el momento, el OMG ha mostrado ausencia de excreción por lágrimas, heces, orina, vagina ni semen, persistencia en ganglios linfáticos u órganos inferior a 8 semanas, y ausencia de transmisión vertical a fetos. Por lo tanto, no se espera presencia del OMG en el medio ambiente; en cualquier caso, tendría una supervivencia muy limitada en el ecosistema. En todas las manipulaciones del OMG y de los animales se utilizarán métodos de desinfección de materiales y superficies.



Tratamiento del lugar tras la liberación

De acuerdo con la experiencia existente, durante el periodo que los animales estarán en el IGM (desde la vacunación hasta la mitad de la gestación), no se espera que exista excreción del mismo por parte de los animales.

El agente OMG será inoculado a los animales por vías subcutánea (zona axilar izquierda) o conjuntival (30 μ L/ojo, con ayuda de una micropipeta) por personal experimentado y con experiencia. Los derrames son poco probables y, para minimizarlos, se llevará siempre a mano material para desinfectar inmediatamente la zona afectada. En ese caso, la cama desinfectada se dispondrá en bolsas para su autoclavado y se tomarían hisopos de la zona desinfectada para comprobación microbiológica (en el medio de cultivo selectivo que permite el crecimiento del OMG) y molecular (PCR).

Una vez finalizado el estudio, se procederá a realizar una limpieza posterior con agente desinfectante (Virkon) de las superficies donde se alojan los animales, y se procederá a la recogida y eliminación del estiércol según el método descrito más adelante, y posterior limpieza y desinfección de la nave con Virkon (Zotal).

Tratamiento del OMG tras la liberación

No se realizará ningún tratamiento sobre el OMG ya que este será inoculado a animales experimentales y no se espera su excreción.

En cuanto el tipo y cantidad de residuos producidos, en el momento de la vacunación, se producirán residuos de jeringuillas, agujas y puntas de micropipeta contaminados con el OMG, así como los guantes, mascarillas y buzos desechables empleados durante este proceso.

Por parte de los animales, el único residuo generado durante el periodo de estudio (desde inoculación hasta mitad de gestación) será el estiércol y las aguas residuales. En cualquier caso, se recuerda que no se espera que estos residuos estén contaminados con el agente OMG ya que los animales inoculados no lo excretarían y, en su caso, el OMG tendría escasa persistencia en el medio ambiente.

Finalmente, dentro del protocolo experimental se incluye monitorización (excreción vaginal y serología) de un grupo sin vacunar (inoculado con PBS) que se utilizará como centinela para detectar la eventual propagación del OMG en la nave. En el caso de ser detectada la excreción del agente, se procederá a la desinfección profunda tanto de las instalaciones como del estiércol y residuos líquidos, siguiendo para ellos las indicaciones del Protocolo de Gestión de Estiércol en Explotaciones Positivas a Tuberculosis y Brucelosis (MAPA).

Tratamiento de residuos

Los residuos y demás material desechable generado durante la vacunación serán recogidos en un contenedor de residuos sanitario, que será cerrado herméticamente, desinfectado externamente y eliminado mediante una empresa especializada en la gestión de estos residuos.

Las camas del ganado ovino y/o caprino, compuestas por estiércol y paja de cereal, serán almacenados en un estercolero, situado en una parcela del complejo de la Finca Marzanas, que cumple con las condiciones de impermeabilidad, está provisto de una fosa para recoger los



lixiviados y cuenta con prados y tierras dedicadas a la siembra de cereal y de alfalfa. Tras un periodo de almacenamiento mínimo de 5 meses para compostaje, el estiércol suele ser reciclado para uso agrícola en el abonado de prados y tierras dedicadas a la siembra de cereal y de alfalfa. Este protocolo se ha establecido de acuerdo con las recomendaciones para la gestión de estiércol y camas animales en el documento sobre Prevención y Control de la infección por *Coxiella burnetti* en animales y personas (Anderson *et al.*, 2013) donde, al contrario de lo que ocurre con el OMG para el que se solicita el estudio, se contempla la excreción de dicho agente del grupo 3 (Real Decreto 664/1997). Por lo tanto, las medidas de gestión del estiércol se consideran suficientes para controlar la diseminación de agentes del grupo 2 que pudieran haberse derramado por la cama de los animales. El compostaje de estos restos se ha admitido por la CNB anteriormente (B/ES/18/31).

Por su parte, las aguas residuales son recogidas en una fosa de purines y, dado que se componen de deyecciones líquidas de los animales y de agua de limpieza, que no contiene detergentes ni productos contaminantes, también se propone utilizar como abono. En la fosa de purines de la nave experimental se indica que únicamente se recogerá el agua de limpieza de los alojamientos animales tras la finalización del estudio y última retirada del estiércol sólido, donde permanecerá 8 meses, por lo que, teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, no se considera que exista ningún riesgo de contaminación con el OMG.

De todos modos, se indica que la cama de paja, junto a las deyecciones sólidas, absorberá las deyecciones líquidas de los animales, formando con ellos estiércol sólido. Una vez al mes será retirado dicho estiércol sólido, el cual se almacenará en una fosa de hormigón, con suelo impermeable y equipada con un sistema de drenaje y una cisterna para recoger la escorrentía, siguiendo la *Guía de las mejores técnicas disponibles para reducir el impacto ambiental de la ganadería* (MAPA, 2017). El estiércol sólido permanecerá en esta fosa un mínimo de 10 meses. Según el *Protocolo de Gestión de Estiércol en Explotaciones Positivas a Tuberculosis y Brucelosis* (MAPA), el periodo aconsejado de almacenamiento para la inactivación de *Brucella spp.* es de 3 meses, por lo que se considera que la gestión del estiércol sólido es adecuada para la realización del estudio.

Eliminación de cadáveres y residuos orgánicos

Los pequeños rumiantes que participen en estudios experimentales, que hayan sido desafiados con el OMG de tipo 2, y que deban ser sometidos a un estudio post mortem, serán sedados en los alojamientos mediante inoculación intravenosa con xilacina y posteriormente transportados en un remolque a la sala de necropsias, en donde se les inoculará una solución eutanásica. Los cadáveres y posibles restos biológicos se introducirán en sacos impermeables, sellados mediante abrazaderas de plástico y serán conservados a temperatura de refrigeración o congelación hasta su retirada por un gestor autorizado.

Estos restos son considerados como subproductos animales no destinados al consumo humano, concretamente de la categoría I, y gestionados de acuerdo con el Reglamento (CE) 1069/2009 y sus modificaciones. Para ello, son recogidos en un contenedor adecuado y retirados por un gestor autorizado para su destrucción mediante incineración. Posteriormente se procede a la limpieza y desinfección del contenedor.

Desinfección, desinsectación y desratización

Existe un programa de desinfección, desinsectación y desratización, con tratamientos periódicos cada tres meses y/o siempre que las circunstancias así lo requieran, utilizando productos



debidamente autorizados y registrados. En la actualidad este programa es realizado por una empresa externa (empresa Desin-plag). No obstante, el personal laboral de la finca podría hacerse cargo de la realización de dichas tareas, ya que cuentan con la formación adecuada.

Información sobre planes de actuación en caso de emergencia

Se indica que la única situación en la que se podría producir diseminación del OMG es el momento de la vacunación de los animales, por derrame accidental del inóculo. Para minimizarlo, la vacunación será realizada por personal experto y disponiendo de desinfectante (Virkon S, Zotal) a mano para actuar de forma inmediata, en caso necesario. Además de desinfectar el área afectada, la cama y materiales afectados se eliminarán en bolsas para su posterior autoclavado.

No se contempla exposición del OMG a otros animales o personas, excepto los directamente implicados en el estudio. En cualquier caso, la dosis del OMG para causar infección tendría que ser muy elevada ($>10^{10}$ UFC/oveja), no se espera excreción del OMG, la transmisión de *Brucella* entre personas es extremadamente rara (no demostrada hasta la fecha), y la susceptibilidad del OMG a los antibióticos indica que un tratamiento preventivo con doxiciclina u otra tetraciclina del personal que hubiera entrado en contacto con el agente, sería efectivo para prevenir la infección.

Planes de protección de la salud humana y del medio ambiente en caso de que se produzca un efecto no deseable

El accidente podría producirse por inoculación accidental con jeringas o cortes con material contaminados con el OMG; o por aerosoles que entren en contacto directo con conjuntivas o mucosas.

No obstante, el personal dispone de experiencia para el trabajo en condiciones de bioseguridad, así como de las categorías de experimentación animal necesarias. Además, se trata de ganado ovino, cuyo carácter es muy dócil, lo que permite un manejo controlado que reduce los accidentes.

En caso de accidente, se comunicará al Servicio de Prevención del CSIC, para aplicar los protocolos de actuación establecidos y las medidas de diagnóstico y tratamiento que establezcan los médicos. No obstante, la necesidad de altas dosis del OMG para inducir infección, junto con la alta susceptibilidad del mismo a los antibióticos, debería permitir el control inmediato de cualquier infección sin complicaciones.

Manejo de los animales alojados

Dentro de las limitaciones impuestas por los diseños experimentales, revisados y aprobados por el comité de ética de experimentación animal del Instituto, y periódicamente supervisados por el responsable de bienestar animal, los animales son manejados de acuerdo con las necesidades etológicas y fisiológicas propias de la especie, limitando al mínimo la libertad de movimientos, teniendo en cuenta su grado de adaptación y domesticación, de acuerdo con el avance de los conocimientos científicos.

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

No obstante:



- Se deberá Informar a la Autoridad Competente y a la CNB donde se realizará finalmente las pruebas de desafío a las ovejas inoculadas con este OMG.
- Cuando se conozca, además de dónde y cuándo se realice el desafío, se deberá hacer especial hincapié en comunicar las condiciones de bioseguridad en el transporte (acreditación de la desinfección posterior al traslado), puesto que los animales ya estarán vacunados.
- 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 del mismo 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 1 de abril de 2022