



EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE DOS CEPAS DE BRUCELLA MELITENSIS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/18/31, PRIMERA PARTE)

Título del ensayo

Estudio de inocuidad, excreción e infección de dos candidatos vacunales de *Brucella melitensis* (BGV1 y BGV2) en ganado ovino.

Características del ensayo

El objetivo de la liberación es la evaluación de dos candidatos vacunales de *Brucella melitensis* (BGV1 y BGV2) en ganado ovino para obtener una cepa viva más atenuada que Rev1 e igual o más efectiva frente a *Brucella melitensis*. Estos organismos modificados genéticamente (OMG) están clasificados de tipo 2.

Se trata de dos OMG estables indefinidamente, obtenidos a partir de la cepa vacunal Rev1 (OMG1) y de la cepa virulenta *B. melitensis* 16M (OMG2).

Estos OMG provienen del Instituto de Agrobiotecnología (IdAB), cuya actividad fue autorizada en el año 2015 (A/ES/15/05). Así mismo se solicitaron otros estudios para realizar en confinamiento en el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria-Universidad Complutense de Madrid (VISAVET) (notificación A/ES/18/81).

Inicialmente bajo este ensayo de liberación voluntaria se propusieron los siguientes estudios:

- B) Estudio de inocuidad, excreción por semen, infección testicular/ ganglionar y respuesta inmune tras la vacunación con BGV1 o BGV2 en carneros adultos (>1 año de edad), con una duración de 10 semanas.
- C) Estudio de inocuidad, excreción vaginal o por leche, infección placentaria y respuesta inmune tras la vacunación con BGV1 o BGV2 en ovejas gestantes, con una duración de 10 semanas.
- D) Estudio de inocuidad, infección, excreción y respuesta inmune tras la vacunación con BGV1 o BGV2 en ovejas adultas (> 1 año de edad) no gestantes con una duración de 53 semanas.

Posteriormente, con fecha 5 de diciembre de 2018 se realizó una **solicitud excepcional para el estudio A**, notificado como actividad confinada de tipo 2 el 27/09/2018 bajo la notificación A/ES/18/81, para la vacunación corderos de 3-4 meses (prepúberes) para su realización en la finca experimental de Rascafría, en diciembre de 2018, apoyándose en los resultados de los estudios previos aportados, y considerando que se trata del estudio con menor riesgo.

El **estudio A** es un estudio de inocuidad, respuesta inmune y distribución y persistencia de la cepa vacunal en el organismo (bazo, hígado, útero o testículos y glándulas anejas, y ganglios linfáticos cervicales, prescapulares, prefemorales, ilíacos, inguinales y mamarios o escrotales) tras la vacunación de corderos jóvenes (3-4 meses de edad). La duración total del estudio será de 10 semanas y se utilizarán un total de 24 corderos de 3-4 meses que se dividirán en 2 grupos, uno inoculado con la cepa BGV1 y el otro con la cepa BGV2. Las inoculaciones se realizarán por vía subcutánea en la zona axilar izquierda con 2 mL de una suspensión que contenga $2-5 \times 10^{10}$ CFU/mL de la correspondiente cepa atenuada.



Los animales se alojarían separados del resto, en el corral número 5, tal y como se refleja en los planos enviados por el notificador.

Características del Organismo modificado genéticamente (OMG)

Se trata de dos OMG estables indefinidamente, siendo dos cepas vacunales altamente atenuadas:

- 1) OMG 1: BGV1, obtenido de *B. melitensis* Rev1, con delección en el gen *wzm* (Rev1 Δ wzm).
- 2) OMG 2: BGV2 obtenido de *B. melitensis* 16M, con delección en el gen *wzm* (16M Δ wzm).

Los OMG se obtuvieron 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.

La cepa virulenta de referencia *B. melitensis* 16M (organismo receptor de BGV2) está clasificada como patógeno tipo 3 por afectar al ser humano y no existir vacunas para dicha cepa. Sin embargo, el tratamiento antibiótico combinado con doxiciclina y gentamicina, estreptomycinina o rifampicina es efectivo. En humanos *Brucella* produce síntomas inespecíficos de un proceso infeccioso general, con cansancio, mialgia y, en ocasiones, fiebre.

- b) Organismo donante: *Brucella melitensis* 16 M (de OMG BGV2) y la cepa vacunal *B. melitensis* Rev1 (de OMG BGV1).
- c) Inserto: material genético obtenido del organismo donante, que es el 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 los mutantes en *wzm* están altamente atenuados. 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 suicida para *Brucella* spp., de manera que si no se integra en el genoma de la bacteria, es incapaz de replicarse y desaparece. El plásmido derivado del vector pJQK (también llamado pJQKm) no puede replicarse en *Brucella melitensis*, lo que lleva a su extinción. En este vector se ha clonado el ORF delecionado obteniéndose el vector pJQK Δ wzm.



La cepa Rev1 utilizada como parental de BGV1 no posee resistencias antibióticas adicionales a las naturales de esta cepa y la cepa 16M utilizada como parental de BGV2 es resistente a ácido nalidíxico, utilizado como marcador de selección.

e) OMG resultantes:

- BGV1: Rev1 con delección en el gen *wzm* (Rev1 Δ wzm) y
- BGV2:16M con delección en el gen *wzm* (16M Δ wzm).

Instalación

Localización geográfica: Granja experimental, Finca la Dominguita, en Rascafría, Madrid.

La finca tienen un cierre perimetral completo, con señalización del acceso restringido. La apertura es mediante llave y control de entrada.

El estudio propuesto se realizará en el corral 5 de las instalaciones que constan de 4 corrales en una nave de 1.500 m². Las características de la nave son las siguientes:

- 1) Laboratorio básico con neveras y congelador. No se van a procesar aquí las muestras de este estudio, ya que se transportarán a VISAVET-UCM para su análisis.
- 2) Vestuario con pediluvio.
- 3) 4 Corrales independientes y compartimentables de hormigón para alojamiento de animales (capacidad máxima, 150 bovinos/400 ovino-caprino), con tabiques, paredes y suelos lavables y desinfectables. Dentro de los corrales los locales de animales están separados mediante puertas bloqueables y se emplearán teleras metálicas para las separaciones de grupos. Disponen de 3 boxes de aislamiento en uno de los alerones externos (necropsias). Los corrales no disponen de alcantarillado.

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

Se aplicarán los siguientes procedimientos:

- Acceso restringido a la finca y granja.
- Se realizará un cambio de ropa de trabajo cuando se manipulen los animales y el OMG.
- Se pondrán pediluvios desinfectantes en el acceso a la nave y a los corrales donde se alojen los animales para la experimentación.
- Se dispondrá de señalización de riesgo biológico en la puerta y en el equipamiento que aloja material biológico.
- Procedimientos normalizados de trabajo que incluyen todas las actividades: gestión de muestras, material punzante, residuos, cadáveres, equipos de protección individual no reutilizables para el personal.
- Necropsia de los animales existentes en la propia granja.
- Limpieza y desinfección de los corrales tras vaciado.
- Seguimiento de muestras tomadas semanalmente de semen, fluidos, placenta, leche, etc.



- Limpieza y desinfección del área de toma de muestra en caso de resultados insatisfactorios.
- Los cadáveres se gestionan como SANDACH tipo I.
- Las muestras se llevarán al laboratorio del VISAVET dado de alta para uso de OMG tipo 2 siguiendo la normativa de transporte de OMG.
- El transporte de los OMG hasta su destino se realizará por personal responsable del IdAB-CSIC, siguiendo la normativa internacional UN3373, con embalaje de triple protección y sellado, acompañado de documentación informativa y las advertencias pertinentes para evitar que sea manipulado por personal no cualificado.

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 los OMG, que es 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) y 16M Δ wzm (BGV2) son altamente sensibles a la desecación y a los detergentes. Además, ambos OMG son susceptibles a la estreptomycinina (a diferencia de Rev1), la penicilina y otros antimicrobianos. Por otro lado, ambos OMG son extremadamente susceptibles 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 las cepas Rev1 (BGV1) y 16M (BGV2) parentales resisten hasta 3 mg/mL. También se ha observado que BGV1 y BGV1 son mucho más sensibles que sus parentales Rev1 y 16M, respectivamente, al suero convencional ovino y bovino, completo y descomplementado. Se han obtenido por mutagénesis mediante recombinación homóloga que origina la eliminación del gen de interés y la inserción del mismo gen deleciónado, 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 bazo de ratones y la persistencia en el ganglio diana de la vacunación subcutánea (ganglio escapular) en corderos (Barrio, Grilló et al. 2009).



BGV1 y BGV2 se han 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 y BGV2 precisan mayor dosis que las cepas lisas (incluida la cepa vacunal Rev1) para producir infección. Tras lograr la infección, BGV2 presenta un patrón de atenuación similar a Rev1, ya que ambas cepas se eliminan entre 9-12 semanas post-vacunación (PV), mientras que BGV1 está mucho más atenuado, desapareciendo de todos los bazo antes de 4 semanas PV.

Además, BGV1 y BGV2 se han 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 ambos OMG son incapaces de producir infección ni lesiones histológicas en placenta o fetos, mientras que 16M y Rev1 inducen altos niveles de infección placentaria (≈ 7 logs), incluso inoculando dosis 10 veces superiores de los OMG. Además, BGV1 y BGV2 permiten 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 o BGV2::gfp (i.e. los OMG BGV1 y BGV2 marcados 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 y BGV2::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 y BGV2 tienen 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. En corderos, el OMG Bm16MRwzm (equivalente a BGV2) limita su infección al sistema linfático (i.e. ganglios linfáticos y bazo), según los datos publicados (Barrio, Grilló et al., 2009):

Con estos datos, podría esperarse un comportamiento similar de BGV1 y BGV2 en otros seres vivos.

No existen evidencias de que los OMG BGV1 y BGV2 sean infectivos o patógenos 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 o BGV2::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 y BGV2 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 y por OMG similares a BGV2 se limita al sistema linfático (Barrio et al, 2009).

No se ha detectado excreción en fluidos biológicos de Rev1 (Muñoz et al., 2011), Bm16MRwzm(Barrio, Grilló et al., 2009), BGV1::gfp o BGV2::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 ambos OMG puede considerarse muy reducida o nula, debido a que BGV1 y BGV2:

- i. poseen 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 y BGV2 no se multiplican a temperaturas del ambiente $\leq 20^{\circ}\text{C}$ ni a la temperatura corporal ovina 40°C ,
 - Deseccación y luz UV: BGV1 y BGV2 son susceptibles 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 ambos OMG también sean más seguros para infectar al ser humano; y
- vi. no infectan placentas ni fetos y no se excretan 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.

Además, como se ha indicado, no resultó infectada ninguna de las personas involucradas en el manejo de corderos y/o necropsias, toma y procesado de muestras en los estudios de con Bm16MRwzm, BGV1::gfp o BGV2::gfp (González, Grilló et al. 2008; Barrio, Grilló et al., 2009; Zabalza-Baranguá 2017; datos no publicados de BGV1::gfp y BGV2::gfp).

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, 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), para evitar una posible infección del personal por inoculación accidental, que es el principal riesgo.

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 y BGV2 son más susceptibles que Rev1 y otras brucelas a diversos antibióticos, especialmente a los recomendados para el tratamiento de la brucelosis humana, incluida la estreptomina (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 ovino que nos ocupa, 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 3 superior, cerrado con muro y solera de hormigón y puertas con cierre.

En este ensayo se recogerá el estiércol para su almacén y compostaje, mínimo 4 meses, una única vez, al finalizar el estudio.

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

Se realizarán 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 objetos de estudio (BGV1 y BGV2).

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 en el propio corral (paja, heces, orina, etc.) con cal, regando y dejando que actúe un mínimo de 24 horas, tomándose muestra para cultivo con el objeto de validar la desinfección, previo a su retirada y eliminación. Después compostaje de 8 meses.



CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de uso propuestas, **el estudio A propuesto en este ensayo de liberación voluntaria no supone 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 17 de diciembre de 2018