



## EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE HERPESVIRUS DE PAVO MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/22/03)

### 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 y el gen F del virus de la enfermedad de Newcastle, del promotor Zoetis Spain, SL.

### Características del ensayo

El promotor propone un período de liberación de marzo 2022 a diciembre 2023.

Vacunación *in ovo* de pollos para prevenir y/o reducir la mortalidad, los signos clínicos y las lesiones asociadas a la enfermedad de Marek y la bursitis infecciosa, y para prevenir y/o reducir la mortalidad y los signos clínicos asociados a la enfermedad de Newcastle.

La vacunación se realizará en la planta de incubación mediante la aplicación *in ovo* de una única vacunación de un lote de vacuna con un título comercial (aproximadamente 4000 – 11.000 UFP/ds) que se administrará a los huevos a los 18-19 días de embrionación utilizando un equipo automático (Embrex Inovoject). La vacunación *in ovo* de las aves dura un par de horas. Se vacunarán aproximadamente 115.000 huevos de gallina.

Después de la vacunación, las aves serán trasladadas a la granja de pollos de engorde donde los pollos se mantienen en condiciones de cría durante un máximo de 11-12 semanas con medidas de bioseguridad por lo que tendrán poca exposición directa al medio ambiente. Finalmente, las aves serán transportadas al matadero.

### Organismo modificado genéticamente

El OMG (HVT-IBD-ND) consiste en una cepa de Herpesvirus del pavo (HVT) cepa FC-126 asociada que ha sido modificada genéticamente insertando el gen VP2 del virus de la bursitis infecciosa (IBDV) y el gen F del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

### 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) (Familia: *Birnaviridae* Género *Avibirnavirus*) cepa Faragher 52-70. IBDV es un virus de ARN sin envoltura.

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.

-Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV) (Familia: *Paramyxoviridae* Género *Rubulavirus*) cepa D26-76. NDV es un virus de ARN sin envoltura de 15 kb.



La proteína F es una glicoproteína de superficie transmembrana. Es una proteína de fusión que media la penetración del virus y la formación de sincitios. Se ha demostrado que el gen *F* es un antígeno protector importante.

### Modificación genética

La construcción de HVT-IBD-ND se llevó a cabo en dos etapas.

Las células CEF (fibroblastos de embrión de pollo) derivadas de embriones libres de patógenos específicos (SPF) infectadas con HVT se transfectaron con el plásmido que contiene la casete de expresión de la proteína F de NDV flanqueada por secuencia de HVT para su inserción. A continuación, las células CEF se infectaron con el recombinante obtenido y se transfectaron con el plásmido de transferencia que contiene la casete de expresión de VP2 flanqueada por secuencia de HVT para su inserción.

La identidad de los insertos VP2 del IBDV y F del NDV se confirmó mediante secuenciación, PCR y digestión con endonucleasas de restricción y técnicas de inmunotinción con anticuerpos específicos del IBDV y del NDV.

La expresión y traducción satisfactorias de la VP2 del IBDV y la F del NDV se confirmó además mediante un análisis de Western Blot utilizando anticuerpos policlonales específicos del IBDV o del NDV. Los anticuerpos también pudieron detectar la expresión de las proteínas VP2 del IBDV y F del NDV en un ensayo de inmunofluorescencia.

Además, se llevó a cabo la secuenciación del ADN tanto de los insertos como de los sitios HVT flanqueantes.

Se confirmó el crecimiento eficiente de la cepa de la vacuna vectorial en células CEF con características de crecimiento, es decir, la formación de focos típicos de infección (placas) similares a la cepa HVT parental. Los parámetros de supervivencia en el medio ambiente después de la diseminación también fueron similares para la cepa HVT-IBD-ND y la cepa parental HVT, lo que demuestra que la inserción de los genes no cambia las características de la cepa HVT.

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

#### **-Patogenicidad**

Se sabe que la HVT es no patógena 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. La infección es avirulenta en todas las especies aviares susceptibles.

En las aves expuestas, los virus 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 en las células del epitelio del folículo de la pluma, comienza tras aproximadamente una semana o más.

La patogenicidad de la cepa vacunal HVT-IBD-ND se evaluó en estudios con animales no diana con pavos, codornices, faisanes, patos y ratones. Las aves fueron observadas diariamente durante ocho semanas y luego se les practicó una necropsia para comprobar la presencia de la enfermedad de



Marek y de Newcastle y de lesiones de ND. 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 estudios de seguridad en ratones no indicaron ningún potencial de transmisión del HVT-IBD-ND a los mamíferos.

Los resultados de estos estudios confirmaron que la cepa vacunal HVT-IBD-ND tiene el mismo perfil de seguridad que la cepa parental HVT.

#### **-Estabilidad**

La estabilidad del OMG se confirmó mediante el análisis de la secuencia de ADN y PCR.

La estabilidad fenotípica se determinó mediante la coexpresión de los productos génicos y detección por ensayo de inmunofluorescencia dual.

La caracterización del MSV HVT-IBD-ND mediante PCR, secuenciación y análisis de inmunofluorescencia dual no mostró diferencias genéticas y fenotípicas entre los pasajes inferiores y superiores del OMG, lo que confirma la estabilidad de la cepa vacunal.

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

La posibilidad de que la cepa vacunal 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.

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 del HVT en el epitelio del folículo de la pluma es limitada y transitoria en los pollos.

En estudios de diseminación y excreción con HVT-IBD-ND 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 de órgano que la cepa parental. Ninguna de las aves desarrolló signos clínicos asociados a la enfermedad de Marek, Newcastle o la bursitis infecciosa y no se encontraron lesiones bursales macroscópicas ni signos de la enfermedad de Marek en ninguna de las canales de las aves inoculadas.

Actualmente se está llevando a cabo otro estudio de propagación. Los resultados provisionales indican que puede haber una posibilidad de propagación limitada del virus a partir del polvo y la descamación.

En un estudio de diseminación y propagación de pollos a pavos con MSV HVT-IBD-ND y la cepa parental HVT, se demostró que 1 de cada 6 aves en contacto mostraron presencia de la cepa vacunal HVT-IBD-ND en los glóbulos blancos del bazo dos semanas después de la mezcla. En cuanto a la cepa parental, se demostró que 4 de cada 6 pollos y el 100% de los pavos en contacto mostraron la presencia de la cepa HVT en los glóbulos blancos del bazo dos semanas después de la mezcla. En los pavos en contacto, la cepa HVT también se detectó en los glóbulos blancos del bazo a los 42 días en porcentaje elevado.

El OMG tiene las mismas características que la cepa parental HVT en relación con 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. Los lípidos de la envoltura proceden 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.

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 es no patógeno para los mamíferos y las aves, no se esperan efectos adversos por la supervivencia y la dispersión en el medio ambiente.

En un estudio de supervivencia en el medio ambiente de HVT-IBD-ND en condiciones típicas de criadero se observó que permanecía viable durante más de 5 horas a 30°C y a 25°C, y no se detectó ningún virus a las 8 horas y en todos los puntos de tiempo posteriores para cualquiera de las dos temperaturas. Como virus de ADN envuelto, los herpesvirus tienen generalmente una baja viabilidad en el medio ambiente y pueden ser fácilmente destruidos por la luz solar, la desecación y también la desinfección. Por el contrario, se encontró que los residuos y el polvo de los pollos vacunados con HVT-IBD-ND y HVT parental permanecieron infecciosos durante 11 días en otro estudio, ya que los residuos parecen proteger al virus de la destrucción. Se ha informado que los virus de la enfermedad de Marek en plumas secas y residuos permanecen infecciosos hasta un año. Por lo tanto, es posible que el HVT-IBD-ND tenga tiempos de supervivencia igualmente largos en los residuos, lo que permitiría la dispersión del virus en el medio ambiente. Sin embargo, en este estudio no se aislaron virus vivos (HVT-IBD-ND o HVT parental) en los residuos y el polvo 22 días después de la vacunación.

La propagación del OMG entre los pollos, aunque no se observa en el estudio de dispersión es, a lo sumo, muy limitada y comparable a la de la cepa parental. Debido a la limitada capacidad de propagación en los pollos (a través del polvo de las plumas y en menor medida a través de las heces), no se esperan interacciones significativas con otros organismos. 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-ND constituya un problema sanitario importante, ya que el virus de la vacuna no tiene potencial para multiplicarse en el medio ambiente y es no patógeno.

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

Los virus de la enfermedad de Marek, incluido el HVT, albergan secuencias genéticas homólogas a las encontradas en las especies aviares y, durante la latencia en los linfocitos infectados, se congregan de 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. 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 de campo (serotipo 1) en pollos o en especies no diana. Del mismo modo, no hay informes 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.

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.

Por lo tanto, la posibilidad de un evento de recombinación *in vivo* es una posibilidad teórica debido al ciclo de replicación similar del HVT y de otros serotipos del MDV, pero hasta la fecha no se ha informado de tales eventos.

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

La vacuna HVT-IBD-ND 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 mochila 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 22 de marzo de 2022